



**TUGAS AKHIR - SB141510**

# **POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PENGHASIL HORMON PERTUMBUHAN AUKSIN**

**FAHIMA TAHTA KHOLIDA  
1511 100 064**

**Dosen Pembimbing  
Dr. Enny Zulaika, M.P**

**JURUSAN BIOLOGI  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**



**FINAL PROJECT - SB141510**

# **INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY THE ISOLATE OF AZOTOBACTERIAL**

**FAHIMA TAHTA KHOLIDA  
1511 100 064**

**Advisor Lecturer  
Dr. Enny Zulaika, M.P**

**BIOLOGY DEPARTMENT  
FACULTY OF MATHEMATICS AND SCIENCE  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PENGHASIL HORMON PERTUMBUHAN AUKSIN

#### TUGAS AKHIR

Diajukan untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
pada

Jurusan S-1 Biologi

Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

**FAHIMA TAHTA KHOLIDA**  
**NRP. 1511 100 064**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir:

Dr. Enny Zulaika, M.P. .... (Pembimbing)

Surabaya, 8 Juni 2015



Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi

Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si.  
NIP. 19690907 199803 2 001

## **POTENSI *Azotobacter* SEBAGAI PENGHASIL HORMON PERTUMBUHAN AUKSIN**

Nama Mahasiswa : Fahima Tahta Kholida  
NRP : 1511 100 064  
Jurusan : Biologi  
Dosen Pembimbing : Dr. Enny Zulaika, MP.

### **Abstrak**

*Azotobacter* memiliki kelebihan dibandingkan dengan bakteri rhizosfer lainnya karena *Azotobacter* dapat menambat N atmosferik. *Azotobacter* juga mampu mensintesis hormon pertumbuhan IAA, golongan auksin alami yang paling melimpah dan terlibat dalam regulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Berdasarkan kemampuannya tersebut dilakukan penelitian untuk menguji potensi *Azotobacter* yang diisolasi dari Eco Urban Farming ITS sebagai penghasil IAA. Uji kualitatif dilakukan untuk penapisan *Azotobacter* yang mempunyai indikasi menghasilkan hormon IAA dengan metode Salkowksi pada media NA triptofan. Selanjutnya dilakukan uji kuantitatif untuk mengetahui konsentrasi hormon IAA yang mampu dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* dengan metode determinasi kolorimetri yang ditunjukkan dengan pereaksi Salkowksi pada media Nutrient Broth yang disuplementasi triptofan. IAA yang terbentuk diukur menggunakan spektrofotometer dengan  $\lambda=530$  nm. Isolat yang mampu menghasilkan IAA adalah *Azotobacter* A1a, A1b, A3, A6, A9, dan A10. Isolat *Azotobacter* A1a, A9 dan A10 dapat memproduksi IAA lebih besar dibanding yang lain. Konsentrasi IAA terbesar dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* A10 mencapai 9,45 ppm, diikuti isolat *Azotobacter* A9 sebesar 7,38 ppm dan isolat *Azotobacter* A1a sebesar 5,40 ppm.

**Kata kunci:** *Azotobacter*, hormon auksin, IAA, konsentrasi.



## **INDOLE ACETIC ACID PRODUCTION BY THE ISOLATE OF AZOTOBACTERIAL**

Student Name : Fahima Tahta Kholida  
NRP : 1511 100 064  
Department : Biologi  
Advisor : Dr. Enny Zulaika, MP.

### **Abstract**

*Azotobacter has a beneficial value compared with other rhizosphere bacteria because Azotobacter can fix atmospheric nitrogen. Azotobacter is also able to synthesize growth hormone IAA, the most abundant natural auxin group, and it is involved in the regulation of plant growth and development. Based on that potential, the research was conducted to test the potential Azotobacter which was isolated from Eco Urban Farming ITS, as a producer of IAA. Qualitative test was done to screen Azotobacter that indicate producing hormones IAA with Salkowksi method on NA tryptophan. Then, quantitative test was done to measure the amount of the concentration of IAA hormone which was produced by Azotobacter isolate using colorimetric determination method, which was shown by Salkowksi reagent on Nutrient Broth medium, that is supplemented by tryptophan. Formed IAA was measured using spectrophotometer  $\lambda=530\text{nm}$ . The result shown that the isolate that can produce IAA is Azotobacter A1a, A1b, A3, A6, A9, and A10. Azotobacter A1a, A9 and A10 can produce IAA higher than others. The largest concentration of IAA produced by isolate Azotobacter A10 which can reach 9.45 ppm, followed by A9 isolate Azotobacter with 7.38 ppm and isolate Azotobacter A1a with 5.40 ppm.*

**Key word :** Azotobacter, auxin hormone, IAA, consentrarion



## KATA PENGANTAR

Segala puji syukur dipanjatkan kepada kehadiran Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penyusunan laporan Tugas Akhir dengan judul **Potensi *Azotobacter* sebagai Penghasil Hormon Pertumbuhan Auksin**. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari-April 2015. Penyusunan Tugas Akhir ini merupakan suatu syarat untuk memperoleh gelar strata 1 (S1), Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Pada penyusunan laporan Tugas Akhir ini tidak lepas dari bimbingan dari berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada para pihak yang membantu terselesaikannya laporan Tugas Akhir ini, yaitu Ibu Dr. Enny Zulaika, MP., selaku dosen pembimbing, Ibu Dini Ermavitalini, S.Si, M.Si dan Ibu N. Dwianita Kuswyasari, S.Si, M.Si selaku dosen penguji. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada orangtua, saudara, dan teman-teman seperjuangan angkatan 2011 yang telah memberikan dukungan baik moril maupun materil.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan Tugas Akhir ini masih memiliki banyak kekurangan. Namun, besar harapan penulis semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat untuk berbagai pihak.

Surabaya, 8 Juni 2015

Fahima Tahta Kholida





## DAFTAR ISI

### Halaman

HALAMAN JUDUL (INDONESIA).....	i
HALAMAN JUDUL (ENGLISH).....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	v
ABSTRAK.....	vii
<i>ABSTRACT</i> .....	ix
KATA PENGANTAR.....	xi
DAFTAR ISI.....	xiii
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	2
1.3 Batasan Masalah .....	2
1.4 Tujuan.....	2
1.5 Manfaat.....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Azotobacter</i> .....	5
2.2 Hormon Auksin.....	7
2.2.1 Hormon <i>Indole-3-Acetic Acid</i> (IAA).....	7
2.2.2 Jalur Biosintesis IAA.....	8
2.3 Biofertilizer (Pupuk Hayati).....	11
2.4 Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> spp.....	12
BAB III METODOLOGI	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	15
3.2 Metode yang Digunakan.....	15
3.2.1 Isolat yang digunakan.....	15
3.2.2 Pembuatan subkultur <i>Azotobacter</i> .....	15
3.2.3 Penapisan Isolat <i>Azotobacter</i> .....	15
3.2.4 Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> .....	16

3.2.5 Uji Produksi Hormon IAA.....	16
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data.....	19
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Penapisan Isolat <i>Azotobacter</i> Penghasil IAA.....	21
4.2 Umur Perlakuan ( $\mu$ jam) Starter.....	23
4.3 Kurva Standar IAA.....	25
4.4 Produksi IAA oleh Isolat <i>Azotobacter</i> .....	26
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA .....	41
LAMPIRAN.....	49
BIODATA PENULIS.....	59

## DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 4.1	Hasil Penapisan Isolat <i>Azotobacter</i> yang Berpotensi Menghasilkan Hormon IAA...	23
Tabel 4.2	Produksi IAA secara Kuantitatif oleh Isolat A9, A1a, dan A10.....	30



## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 <i>Azotobacter vinelandii</i> .(a)Sel Vegetatif dan (b) cysts.....	6
Gambar 2.2 <i>Azotobacter</i> sp.....	7
Gambar 2.3      Struktur Kimia <i>Indole-3-Acetic Acid</i> (IAA).....	8
Gambar 2.4      Diagram Jalur Trp untuk Biosintesis IAA pada Bakteri.....	9
Gambar 3.1      Area Perhitungan <i>haemocytometer</i> .....	18
Gambar 4.1      Isolat <i>Azotobacter</i> (A1a, A1b, A3, A6, A9, A10) yang Mampu Memproduksi IAA Ditunjukkan dengan Warna Kemerahan setelah Ditetesi Pereaksi Salkowski.....	22
Gambar 4.2      Kurva Pertumbuhan <i>Azotobacter</i> A9, A1a, dan A10.....	24
Gambar 4.3      Kurva Standar IAA.....	26
Gambar 4.4      Diagram Batang Hasil Uji Produksi IAA pada Isolat <i>Azotobacter</i> A1a, A9 dan A10.....	28
Gambar 4.5-a      Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat <i>Azotobacter</i> A9 pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.....	31

Gambar 4.5-b	Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat <i>Azotobacter</i> A1a pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.....	33
Gambar 4.5-c	Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat <i>Azotobacter</i> A10 pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.....	35

## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Komposisi Reagen.....	49
Lampiran 2: Skema Kerja.....	49
Lampiran 3: Hasil Uji Statistik.....	53
Lampiran 4: Tabel Absorbansi IAA.....	57
Lampiran 5: Subkultur Isolat <i>Azotobacter</i> .....	58





## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **1.1 Latar Belakang**

Beberapa bakteri rhizosfer mampu memfiksasi nitrogen bebas di udara dan memiliki potensi lain yang bermanfaat untuk tanaman, di antaranya memproduksi antibiotik, *siderophores*, dapat memproduksi hormon (Halda dan Alija, 2003). Hormon pertumbuhan yang dihasilkan oleh bakteri rhizosfer terdapat 3 jenis yaitu auksin, sitokinin, dan giberelin. Hormon yang paling sering dihasilkan oleh mikroba adalah *indole-3-acetic acid* (IAA) (Sutarya, 2011).

Salah satu rhizobakteri adalah *Azotobacter* yang memiliki kelebihan dibandingkan dengan bakteri rhizosfer lainnya karena *Azotobacter* dapat menambat N atmosferik, selain itu *Azotobacter* juga mampu mensintesis hormon pertumbuhan yaitu IAA (Widiastuti dkk., 2010). *Azotobacter chroococcum* strain KG3 berpotensi menghasilkan hormon IAA sampai dengan 56µg/L (Mali dan Bodhankar, 2009). Fungsi zat pengatur tumbuh IAA dapat merangsang pertumbuhan akar tanaman sehingga akar tanaman akan tumbuh dan berkembang lebih baik. Pertumbuhan akar yang lebih baik akan membantu dalam penyerapan unsur hara oleh tanaman dari dalam tanah (Sutarya, 2011).

Pada penelitian sebelumnya, telah didapatkan isolat *Azotobacter* yang diisolasi dari *Eco Urban Farming* ITS dan berpotensi menghasilkan enzim merkuri reduktase yang dapat digunakan untuk mendegradasi logam berat merkuri HgCl<sub>2</sub> (Sakinah dan Zulaika, 2014). Selain itu, isolat *Azotobacter* tersebut juga dapat mendegradasi karbohidrat (Zulaika *et al.*, 2014). Berdasarkan potensi tersebut, diharapkan isolat *Azotobacter* tersebut memiliki potensi yang lain yaitu menghasilkan hormon auksin, sehingga dapat digunakan sebagai agen bioremediasi merkuri sekaligus sebagai agen biofertilizer.

## 1.2 Rumusan Permasalahan

*Azotobacter* isolat A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9 dan A10 adalah isolat yang berasal dari *Eco Urban Farming* ITS dan merupakan koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi FMIPA ITS. Sebagai bakteri tanah diharapkan *Azotobacter* mampu menghasilkan hormon auksin, sehingga dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut :

1. Apakah semua isolat di atas berpotensi menghasilkan hormon auksin?
2. Jika isolat *Azotobacter* di atas berpotensi menghasilkan hormon auksin, berapakah konsentrasi auksin yang dihasilkan?

## 1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini meliputi :

1. Isolat *Azotobacter* yang digunakan adalah isolat A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9 dan A10 yang resisten  $\text{HgCl}_2$  5 mg/L (Sakinah dan Zulaika, 2014; Khotimah dan Zulaika, 2014).
2. Isolat yang dipilih uji produksi hormon IAA adalah isolat yang mempunyai indikasi lebih banyak menghasilkan hormon IAA.
3. Hormon auksin yang digunakan untuk kurva standar adalah IAA (*Indole-3-Acetic Acid*).
4. Media NB yang digunakan dengan pH 7 (El-Mahrouk dan Belal, 2007).

## 1.4 Tujuan

Penelitian bertujuan untuk :

1. Mendapatkan isolat *Azotobacter* yang berpotensi menghasilkan hormon auksin yaitu IAA (*Indole-3-Acetic Acid*).
2. Mengetahui konsentrasi hormon IAA yang dihasilkan.

### **1.5 Manfaat**

Berdasarkan hasil penelitian diharapkan isolat *Azotobacter* yang berpotensi menghasilkan hormon IAA dapat dimanfaatkan sebagai agen biofertilizer dan sekaligus sebagai agen bioremediasi merkuri  $\text{HgCl}_2$ .

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB II**

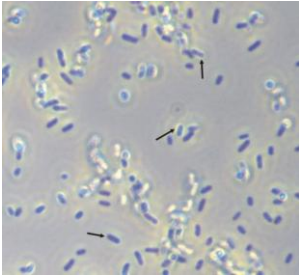
### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1 *Azotobacter***

*Azotobacter* adalah bakteri heterotrof yang memerlukan bahan organik sebagai sumber karbon dan energi. Bakteri ini juga dapat tumbuh di media dengan nitrogen (Holt *et al.*, 1994). Energi aktivasi fiksasi  $N_2$  diturunkan dengan biokatalisator nitrogenase yang aktivitasnya tergantung dari logam Fe dan Mo (Hindersah dkk., 2013). *Azotobacter* adalah salah satu mikroba yang hidup di rizosfer tanaman dan banyak digunakan sebagai pupuk hayati (Hindersah *et al.*, 2010).

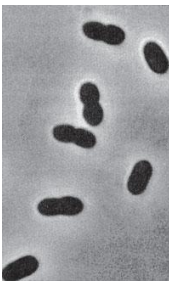
*Azotobacter* sp. adalah bakteri gram negatif, bersifat aerobik, polymorphic dan mempunyai berbagai ukuran dan bentuk. Bakteri ini memproduksi polisakarida. Terdapat empat spesies penting dari *Azotobacter* yaitu *A. chroococcum*, *A. agilis*, *A. paspali* dan *A. vinelandii* dimana *A. chroococum* adalah spesies yang paling sering ditemui di dalam kandungan tanah. *Azotobacter* mempunyai sifat aerobik maka dari itu bakteri ini memerlukan oksigen sehingga dengan adanya aerasi, pertumbuhan dari *Azotobacter* dapat ditingkatkan (Saribay, 2003). *Azotobacter* mampu mengubah nitrogen ( $N_2$ ) dalam atmosfer menjadi amonia ( $NH_4^+$ ) melalui proses pengikatan nitrogen dimana amonia yang dihasilkan diubah menjadi protein yang dibutuhkan oleh tanaman (Hamstuti dkk., 2012).

Sel *Azotobacter* berbentuk rod besar atau cocci (Gambar 2.1), banyak isolat yang mempunyai ukuran seperti yeast (eukariot). Mempunyai diameter 2-4  $\mu m$  atau lebih. Beberapa spesies adalah motil dengan flagel peritrikus. Ketika mereka tumbuh di  $N_2$  sebagai sumber nitrogen, perluasan kapsul atau lapisan lendir biasanya diproduksi oleh spesies dari bakteri yang menfiksasi nitrogen bebas. Lapisan tersebut melindungi enzim nitrogenase di dalam sitoplasma (Madigan *et al.*, 2012).

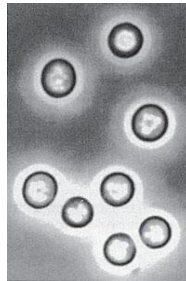


Gambar 2.2 *Azotobacter* sp.( Thot *et al.*, 2013).

Nitrogenase dari *Azotobacter*, enzim yang mengkatalis fiksasi  $N_2$  sensitif terhadap keberadaan  $O_2$  meskipun *Azotobacter* merupakan obligat aerob. Diperkirakan tingginya tingkat respirasi sel *Azotobacter* dan berlimpahnya kapsul lendir yang dihasilkan membantu melindungi nitrogenase dari  $O_2$ . *Azotobacter* dapat tumbuh di berbagai karbohidrat, alkohol dan asam organik yang berbeda, dengan metabolisme stricly oksidatif. Semua spesies menfiksasi nitrogen, tetapi juga dapat tumbuh pada bentuk sederhana dari nitrogen. *Azotobacter* dapat membentuk struktur istirahat yang disebut cysts (Madigan *et al.*, 2012). Bentuk cyst dapat dilihat pada Gambar 2.2



(a) sel vegetatif



(b) cyst

Gambar 2.2 *Azotobacter vinelandii* (Madigan *et al.*, 2012).

Salah satu spesies *Azotobacter* yaitu *A.chroococcum* sangat menguntungkan bagi tanaman pertanian karena diantaranya yaitu

memiliki kemampuan untuk menghasilkan amonia, vitamin dan zat pertumbuhan yang meningkatkan perkecambahan biji, produksi asam indole asetat dan hormon lain yaitu giberelin dan sitokinin (Mali & Bodhankar, 2009).

## **2.2 Hormon Auksin**

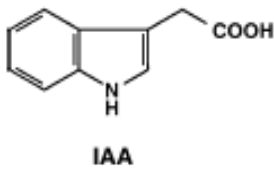
Auksin merupakan salah satu dari Zat Pengatur Tumbuh (ZPT) (Arlianti dkk., 2007). Zat pengatur tumbuh (ZPT) adalah sejenis hormon yang terdapat pada tumbuhan yang bertanggung jawab dalam mengendalikan keseluruhan proses metabolisme dan fisiologis yang terjadi pada tanaman. Auksin berperan dalam pertumbuhan dan pemanjangan sel, dapat menginduksi pembelahan sel serta diferensiasi sel, membantu proses pembentukan buah, menghambat proses absisi, berperan dalam terjadinya dominansi apikal, dan menyebabkan terbentuknya akar *adventitious* (Karjadi dan Buchori, 2007).

Auksin berpengaruh hanya pada kisaran konsentrasi tertentu, yaitu sekitar  $10^{-8}$  sampai  $10^{-3}$  M. Pada konsentrasi yang lebih tinggi, auksin bisa menghambat pemanjangan sel. Hal ini barangkali disebabkan oleh tingginya level auksin yang menginduksi sintesis hormon lain, yaitu etilen yang bekerja sebagai inhibitor pertumbuhan tumbuhan akibat pemanjangan sel (Campbell *et al.*, 2000).

### **2.2.1 Hormon *Indole-3-Acetic Acid* (IAA)**

*Indole-3-Acetic Acid* (IAA) merupakan anggota utama dari kelompok auksin yang mengendalikan banyak proses fisiologis penting termasuk pembesaran dan pembelahan sel, deferensiasi jaringan dan respon terhadap cahaya dan gravitasi (Teale *et al.*, dalam Shokri and Emtiazi, 2010). IAA memiliki struktur kimia yang dapat dilihat pada Gambar 2.3.





Gambar 2.3 Struktur Kimia *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) (Dobrev, 2005).

Berbagai mikroorganisme termasuk bakteri, jamur, dan ganggang mampu secara fisiologis aktif menghasilkan sejumlah auksin yang mungkin memberikan efek yang menonjol pada pertumbuhan tanaman (Shokri and Emtiazi, 2010).

Fitohormon IAA diketahui dapat menghasilkan lebih banyak akar lateral, rambut akar dan cabang rambut akar. Hal ini berdasarkan penelitian yang telah dilakukan Lestari dkk., (2007) yang menyimpulkan bahwa semakin tinggi jumlah AIA yang diproduksi oleh *Azospirillum*, semakin baik pengaruhnya terhadap perkembangan akar padi.

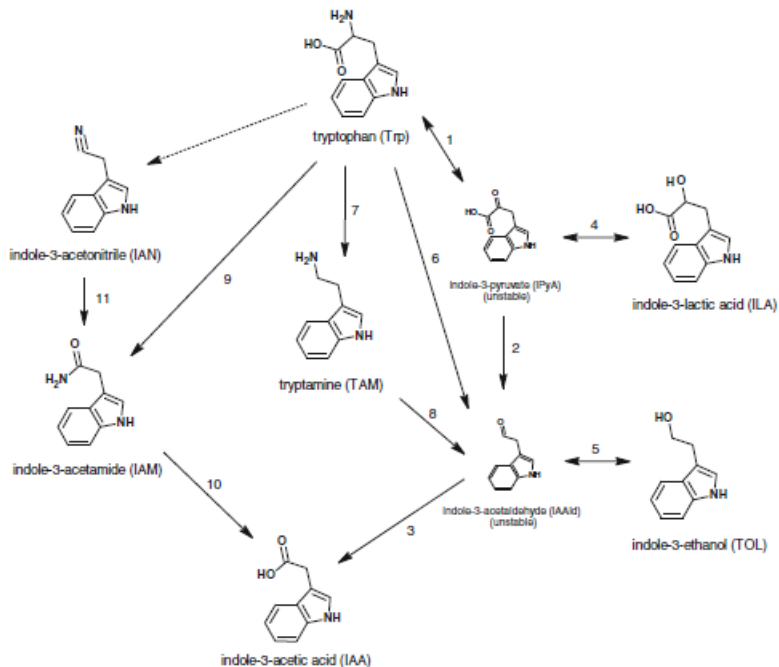
### 2.2.2 Jalur biosintesis IAA

*Indole-3-acetic acid* (IAA) adalah auksin alami yang paling melimpah, yang merupakan kelas fitohormon yang terlibat dalam regulasi pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Melalui identifikasi gen bakteri dan aktivitas enzim serta deteksi zat indolik intermediat pada supernatan kultur bakteri, keberadaan lima rute biosintesis IAA yang berbeda telah ditentukan dengan triptofan (Trp) sebagai prekursor, indole-3-piruvat (IpyA), indole-3-asetamida (IAM), triptamin (TAM), indole-3-asetonitril (IAN) dan jalur Trp cincin samping oksidase (Szkop & Bielawski, 2013).

Eksudat akar merupakan sumber alami L-triptofan untuk mikroorganisme rizhosfer yang dapat meningkatkan produksi IAA di daerah rizosfer (Chaiarn dan Lumyong, 2011). Biosintesis

IAA dalam tanah dapat dipacu dengan adanya triptofan yang berasal dari eksudat akar atau sel-sel yang rusak atau membusuk (Chaiharn dan Lumyong, 2011).

Jalur biosintesis IAA oleh bakteri secara skematis dapat dilihat pada Gambar 2.4.



Gambar 2.4 Diagram Jalur Trp untuk Biosintesis IAA pada Bakteri (Carreno-Lopez et al, 2007 dalam Szkop & Bielawski, 2013).

Keterangan gambar : (1) Asam amino aromatik aminotransferase, (2) IpyA dekarboksilase, (3) IAAld dehidrogenase, (4) ILA dehidrogenase, (5) TOL dehidrogenase, (6) Trp sidechain-oxidase, (7) Trp dekarboksilase, (8) TAM oksidase, (9) Trp 2-monooksigenase, (10) IAM hidrolase, (11) nitrilase.

### Jalur *Indole-3-acetamide*

*Indole-3-acetamide* (IAM) merupakan jalur yang terbaik yang dikarakterisasi pada bakteri. Pada jalur ini terdapat dua langkah. Pertama, triptofan dikubah menjadi IAM dengan menggunakan enzim tryptophan-2-monooxygenase (IaaM) yang disintesis gen oleh *iaaM*. Kedua, IAM diubah menjadi IAA oleh IAM hidrolase (*IaaH*). Kedua enzim ini telah dikarakterisasi dari beberapa bakteri yaitu, *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Pantoea agglomerans*, *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* (Spaepen *et al.*, 2007).

### Jalur *Indole-3-pyruvate*

Jalur *IpyA* ini dianggap sebagai jalur utama untuk biosintesis IAA pada tanaman. Namun gen kunci dari jalur ini belum teridentifikasi pada tanaman. Pada bakteri, produksi IAA melalui jalur *IpyA* ini telah dibuktikan pada berbagai bakteri. Contohnya adalah *Bradyrhizobium*, *Azospirillum*, *Rhizobium*, *Enterobacter cloacae*, and cyanobacteria. Langkah pertama pada jalur ini adalah pengubahan triptofan menjadi *IpyA* oleh aminotransferase. *IpyA* mengalami dekarboksilasi menjadi indole-3-acetaldehyde (IAAId) oleh *indole-3-pyruvate decarboxylase* (IPDC). Langkah terakhir, IAAId dioksidasi menjadi IAA. Gen yang menyandi enzim kunci IPDC telah diisolasi dan dikarakterisasi dari *Azospirillum brasilense*, *En. cloacae*, *Pseudomonas putida* dan *Pa. agglomerans* (Spaepen *et al.*, 2007).

### Jalur *Tryptamine*

Pada bakteri, jalur tryptamine (TAM) telah diidentifikasi pada *Bacillus cereus* oleh aktivitas tryptophan decarboxylase (Spaepen *et al.*, 2007) dan pada *Azospirillum* ditemukan pengubahan dari eksogenus tryptamin menjadi IAA. Langkah terakhir jalur pada bakteri, TAM langsung diubah menjadi IAAId oleh *amine oxidase* (Spaepen *et al.*, 2007).

#### Jalur *Tryptophan side-chain oxidase*

Aktivitas jalur *tryptophan side-chain oxidase* (TSO) hanya ditemukan pada *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Pada jalur ini triptofan langsung diubah menjadi IAAld tanpa melalui IpyA, kemudian dioksidasi menjadi IAA (Spaepen *et al.*, 2007).

#### Jalur *Indole-3-acetonitrile*

Jalur biosintesis pengubahan dari *indole-3-acetonitrile* (IAN) ke IAA oleh nitrilase telah diidentifikasi. Namun, langkah-langkah yang mengarah ke pembentukan IAN dari triptofan masih diperdebatkan. Pada *Ag. tumefaciens* dan *Rhizobium* spp., menunjukkan konversi dari IAN ke IAA melalui IAM (Spaepen *et al.*, 2007)

Sebagai reaksi sampingan, IpyA direduksi menjadi *indole-3-lactic acid* (ILA) oleh lactate dehydrogenase, yang menghendaki NADH. Dan *Indole-3-ethanol* (TOL) merupakan produk dari reaksi samping IAAld (Lee *et al.*, 2004).

### 2.3 Biofertilizer (Pupuk Hayati)

Pupuk hayati merupakan komponen penting dari manajemen nutrisi yang terpadu. Potensi pupuk hayati ini menjadi kunci dalam produktivitas dan keberlanjutan tanah serta menjaga lingkungan karena ramah lingkungan (Mohammadi dan Sohrabi, 2012). Biofertilizer ini diharapkan dapat mengurangi penggunaan pupuk kimia dan pestisida (Amutha *et al.*, 2014). Beberapa mikroba tanah mempunyai peranan dalam mendukung pertumbuhan tanaman. Mikroba - mikroba tersebut biasa disebut sebagai mikroba agen biofertilizer (Widawati, 2010).

Biofertilizer merupakan zat yang mengandung mikroorganisme hidup yang apabila diterapkan pada benih, permukaan tanaman atau tanah, mengkolonisasi rizhosfer atau di dalam tumbuhan dan meningkatkan pertumbuhan dengan meningkatkan suplai atau ketersediaan nutrisi penting kepada tanaman inang. Biofertilizer menambahkan nutrisi melalui proses

alami dari fiksasi nitrogen, melarutkan fosfat dan memacu pertumbuhan tanaman dengan mensintesis substansi pemacu pertumbuhan (Amutha *et al.*, 2014). Mikroorganisme yang menguntungkan di dalam pupuk hayati dapat mempercepat dan meningkatkan pertumbuhan tanaman serta melindungi tanaman dari hama dan penyakit (Mohammadi dan Sohrabi, 2012).

#### **2.4 Kurva Pertumbuhan *Azotobacter* spp.**

Pertumbuhan *Azotobacter* spp. yang telah disolasi dari *Eco Urban Farming* ITS mempunyai pola fase yang hampir seragam. Pada kurva *Azotobacter* spp. tidak terjadi fase lag atau fase lag yang dipercepat. Fase log atau eksponensial sudah terlihat pada jam ke 1 hingga jam ke-12 (Sakinah dan Zulaika, 2014). Fase eksponensial merupakan fase dimana pembiakan bakteri berlangsung dengan cepat. Fase stasioner ditemukan setelah jam ke-12 hingga jam ke-19. Selanjutnya terjadi penurunan nilai OD sehingga menunjukkan bahwa bakteri tersebut memasuki fase kematian dari jam ke-20 hingga jam ke-24 akhir pengukuran (Sakinah dan Zulaika, 2014). Pertumbuhan bakteri merupakan penambahan sel dan kemampuan bakteri untuk berkembang biak, yang dapat divisualisasikan dengan kurva pertumbuhan (Cooper, 2003). Menurut Hogg *dalam* Sholikhah dan Kuswytasari (2012) , pada saat fase eksponensial, sel mikroorganisme dalam keadaan yang stabil, sel-sel baru terbentuk dengan laju konstan dan sel mikroorganisme membelah secara optimum pada saat *doubling time* (waktu lipat dua) sehingga biasanya tercapai di tengah-tengah fase eksponensial. Oleh karena karena itu inkubasi yang tepat untuk perlakuan adalah rata-rata fase eksponensial.

Metabolit sekunder termasuk hormon *Indole-3-Acetic Acid* (IAA) yang dihasilkan oleh bakteri. Metabolit sekunder ini dihasilkan saat akhir fase log (Kresnawati dkk., 2008). Metabolit sekunder secara struktural sangat bermacam-macam dan hanya diproduksi dalam jumlah kecil dan masing-masing dari metabolit sekunder dihasilkan hanya oleh beberapa spesies tertentu.

Metabolit sekunder tersebut mempengaruhi efek-efek biologis, walaupun dalam konsentrasi rendah dan dapat dikatakan sebagai agen pembawa komunikasi kimia dalam tanah (Karlovsky, 2008).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Pelaksanaan penelitian dilakukan mulai bulan Januari hingga April 2015 di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi FMIPA, Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

### **3.2 Metode Penelitian**

#### **3.2.1 Isolat yang digunakan**

Isolat yang digunakan untuk penapisan produksi hormon IAA adalah isolat *Azotobacter* dengan kode A1a, A1b, A2, A3, A5, A6, A7, A8, A9 dan A10. Isolat yang digunakan untuk uji produksi hormon IAA adalah tiga isolat dari hasil penapisan yang mempunyai indikasi menghasilkan hormon IAA lebih banyak dibandingkan isolat lainnya.

#### **3.2.2 Pembuatan Subkultur *Azotobacter***

Isolat *Azotobacter* masing-masing diinokulasikan secara aseptis pada media agar miring *Nutrient Agar* (NA). Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam. Keberhasilan subkultur ditunjukkan dengan koloni yang tumbuh pada media tersebut.

#### **3.2.3 Penapisan Isolat *Azotobacter***

Isolat *Azotobacter* diinokulasikan pada media agar datar NA (*Nutrient Agar*) yang disuplementasi triptofan dengan konsentrasi 100ppm menggunakan metode *streak plate*. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Pereaksi Salkowski (Lampiran 1) ditetaskan pada isolat *Azotobacter* yang telah tumbuh di agar datar NA dan disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna koloni isolat menjadi merah. Tiga isolat yang mengalami perubahan warna lebih merah diantara isolat lainnya merupakan isolat yang dipilih dan selanjutnya akan dilakukan uji produksi IAA.



### 3.2.4 Penentuan Umur Starter ( $\mu$ jam) *Azotobacter*

Kurva pertumbuhan digunakan untuk mengetahui umur perlakuan ( $\mu$  jam) dari *Azotobacter* yang akan digunakan untuk uji produksi hormon IAA. Sebanyak 1 ose isolat *Azotobacter* yang positif menghasilkan IAA secara kualitatif dan berumur 24 jam diinokulasikan ke dalam medium NB (*Nutrient Broth*) sebanyak 20 ml sebagai starter. Starter diinkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya 20 ml dari starter ditambahkan ke 180 ml medium NB diinkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Selanjutnya diukur nilai OD (*Optical density*) sebanyak 2 ml dari kultur dimasukkan kuvet menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 600nm (Harley & Prescott, 2002). Pengukuran dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam yang dimulai dari jam ke-0. Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Data kerapatan optik atau OD yang didapatkan, dibuat kurva pertumbuhan dengan sumbu X yang menyatakan waktu dan sumbu Y yang menyatakan hasil OD atau kerapatan optik yang didapatkan. Umur kultur yang digunakan untuk uji produksi hormon IAA adalah  $\mu$  jam yang merupakan waktu fase eksponensial akhir dikurangi waktu fase eksponensial awal dibagi dua dan ditambah waktu fase eksponensial awal.

### 3.2.5 Uji Produksi Hormon IAA

#### Kurva Standar IAA

Konsentrasi IAA untuk kurva standar adalah 2 ; 4 ; 6 ; 8 ; 10 ; 12 ; 14 ; 16 ; 18 ; 20 ppm dari larutan stok IAA 100 ppm (0,01 gram IAA + 100 ml akuades) (Yuniarti & Purwani, 2007). Konsentrasi IAA tersebut dibuat dengan menambahkan IAA dengan media NB. Sebanyak 1 ml masing-masing NB-IAA dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml pereaksi Salkowski dan dihomogenkan. Diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit. Sebagai blanko adalah 1 ml NB dengan 2 ml pereaksi Salkowski. Absorbansi IAA diukur menggunakan

spektrofotometer UV-VIS dengan  $\lambda = 530$  nm (Yuniarti dan Purwani, 2007). Pengukuran absorbansi dilakukan 2 kali pengulangan. Hasil pengukuran larutan standar dibuat kurva dengan sumbu X yang menyatakan konsentrasi IAA dan sumbu Y yang menyatakan nilai absorbansi, kemudian dibuat persamaan garis lurus  $Y = a + bX$ .

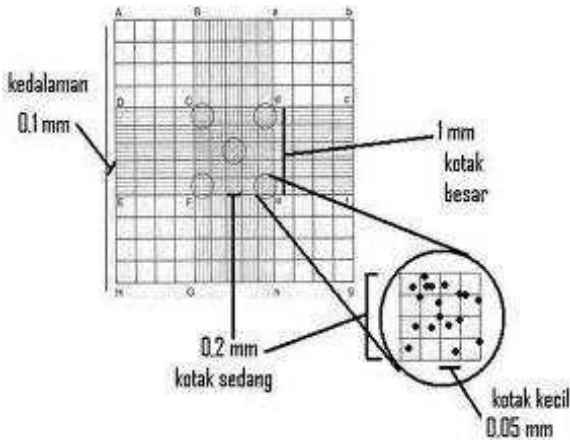
### **Pengukuran Konsentrasi IAA**

Sebanyak 1 ose isolat *Azotobacter* yang akan diuji diinokulasikan ke dalam medium NB 20 ml diinkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang selama 24 jam. Selanjutnya 20 ml kultur tersebut ditambah dengan 180 ml NB yang diinkubasi dengan *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang sampai miu ( $\mu$ ) jam.

Sebanyak 30 ml kultur ditambahkan L-triptofan dengan perlakuan 0 ppm (sebagai kontrol), 1000 ppm, 2000 ppm (Shokri & Emtiazi, 2010) dan 3000 ppm dalam 30 ml kultur. Kultur yang telah ditambah triptofan ditutup dengan kertas karbon dan diinkubasi menggunakan *shaker incubator* dengan kecepatan 100 rpm pada suhu ruang. Dilakukan pengulangan 2 kali.

Kultur yang berumur 0 jam, 24 jam dan 48 jam dari masing-masing konsentrasi L-triptofan dihitung kepadatan selnya menggunakan *haemocytometer* dibawah mikroskop (Gambar 3.1). Sebanyak 1 tetes kultur *Azotobacter* ditetaskan di bidang pengamatan *haemocytometer* kemudian ditutup dengan gelas penutup, penetesan harus dilakukan secara hati-hati supaya tidak terjadi gelembung udara di bawah gelas penutup (Isnansetyo dan Kusnistuty dalam Kusuma dan Zulaika, 2014).

Pada area pengamatan yang berjumlah 5 atau disebut kamar R, sel *Azotobacter* dihitung jumlahnya dengan menggunakan *hand tally counter*. Jika sudah didapatkan jumlah sel *Azotobacter*, untuk mengetahui jumlah *Azotobacter* per 1 ml dihitung menggunakan persamaan (1).



Gambar 3.1 Area Perhitungan *Haemocytometer* (Isnansetyo dan Kusnistuty dalam Kusuma dan Zulaika, 2014).

$$\text{Jumlah sel bakteri/ml} = \frac{N \times \text{pengenceran}}{1/400 \text{ mm}^2 \times 80 \times 1/10 \text{ mm}} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ mL}} \dots\dots(1)$$

(Addis *et al.*, 2001).

Keterangan:

N = jumlah sel yang dihitung menggunakan *hand tally counter* pada 5 kamar R; Pengenceran = jika sebelum perhitungan diperlukan pengenceran;  $1/400 \text{ mm}^2$  = luas setiap kotak kecil dalam kamar R; 80 = jumlah kotak kecil dari kamar R yang dihitung;  $1/10 \text{ mm}$  = kedalaman *haemocytometer*;  $1000 \text{ mm}^3 / 1 \text{ mL}$  = bentuk konversi ke satuan ml.

Kultur yang berumur 0 jam, 24 jam dan 48 jam tersebut diambil sebanyak 2 ml dan disentrifus dengan kecepatan 8000rpm selama 10 menit. Sebanyak 1 ml supernatan dipindahkan ke tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml pereaksi Salkowski (Mohite, 2013). Diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit. Sebagai blanko adalah 1 ml media NB yang ditambahkan 2 ml pereaksi Salkowski, dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan

spektrofotometer UV-VIS dengan  $\lambda = 530\text{nm}$  (Yuniarti & Purwani, 2007). Setiap isolat dilakukan 2 kali pengukuran absorbansinya, kemudian konsentrasi IAA dihitung dengan persamaan garis yang didapat dari kurva standar.

### **3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data**

Penelitian deskriptif dilakukan untuk penapisan isolat *Azotobacter* yang berpotensi menghasilkan hormon IAA. Penelitian kuantitatif dilakukan untuk uji produksi hormon IAA. Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Perlakuan L-triptofan yang digunakan adalah 0 ppm, 1000 ppm, 2000 ppm, dan 3000 ppm dan dilakukan 2 kali pengulangan.

Perbedaan perlakuan diuji dengan *Analysis of Variance* atau ANOVA dengan taraf kepercayaan  $\alpha = 5\%$  dari data yang telah didapatkan. Jika ada beda nyata, maka dilakukan uji menggunakan LSD (*Least Significant Different*). Namun jika data tidak dapat diuji dengan ANOVA digunakan uji Kruskal-Wallis.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## **BAB IV**

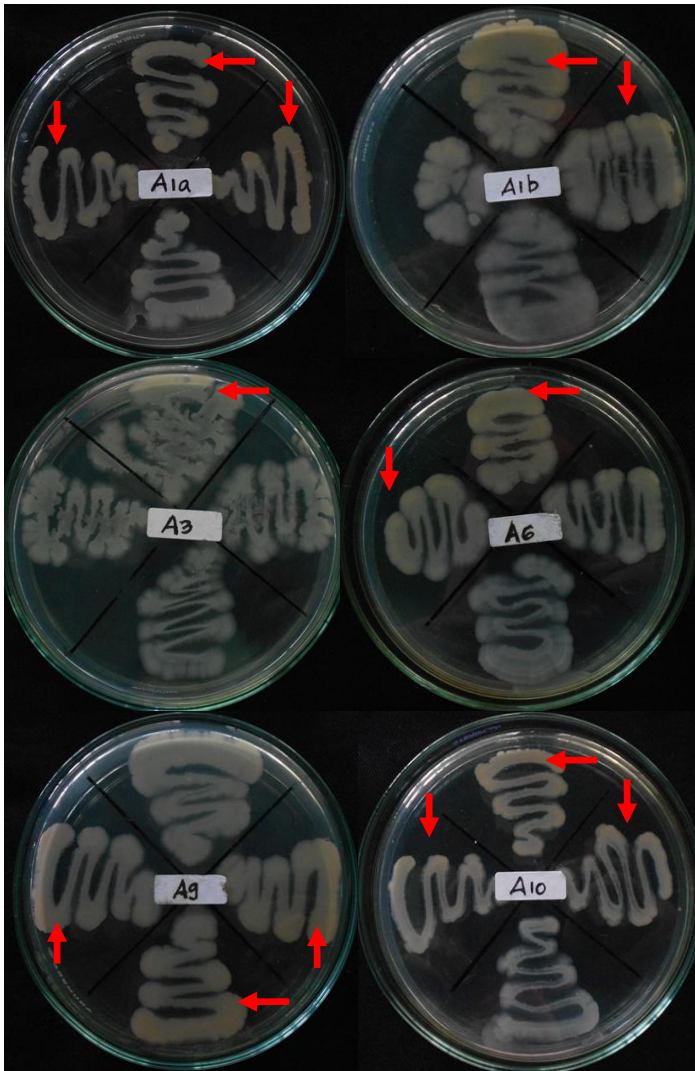
### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **4.1 Penapisan isolat *Azotobacter* Penghasil IAA**

Produksi IAA oleh isolat *Azotobacter* diuji secara kualitatif menggunakan metode Salkowski yang dilakukan dengan streak plate pada agar datar yang disuplementasi dengan triptofan. Suplementasi dengan asam amino triptofan ini dibutuhkan karena triptofan merupakan prekursor primer dalam biosintesis IAA (Tanaka *et al.*, 2002).

Pada uji produksi IAA secara kualitatif, 6 isolat mampu memproduksi hormon IAA yaitu A1a, A1b, A3, A6, A9 dan A10 (Gambar 4.1). Kemampuan menghasilkan IAA ditunjukkan dengan perubahan warna isolat menjadi kemerahan. Sedangkan pada 4 isolat yang lain yaitu A2, A5, A7 dan A8 tidak mengalami perubahan warna.

Menurut Rahman *et al.* (2010) perubahan warna kemerahan pada isolat setelah ditetesi pereaksi Salkowski terjadi karena adanya reaksi antara pereaksi Salkowski dengan IAA atau dengan beberapa senyawa pembentuk IAA. *Indole-3-acetic acid* (IAA) berikatan dengan  $\text{FeCl}_3$  dan  $\text{HClO}_4$  yang merupakan senyawa penyusun pereaksi Salkowski membentuk kompleks tris-(indole-3-aceto) *iron (III)* yang memberikan warna merah. Reaksi terjadinya perubahan warna merah pada isolat *Azotobacter* setelah ditetesi pereaksi Salkowski mengindikasikan kemampuan *Azotobacter* dalam memetabolisme L-triptofan menjadi IAA.



Gambar 4.1 Isolat *Azotobacter* (A1a, A1b, A3, A6, A9, A10) yang Mampu Memproduksi IAA Ditunjukkan dengan Warna Kemerahan setelah Ditetesi Pereaksi Salkowski.

Berdasarkan hasil uji produksi hormon IAA secara kualitatif, terindikasi 6 isolat mampu memproduksi IAA. Isolat yang dipilih untuk uji produksi hormon IAA secara kuantitatif hanya 3 isolat yaitu A9, A10 dan A1a (Tabel 4.1). Isolat *Azotobacter* A9 dan A10 dipilih karena memiliki perubahan warna kemerahan yang paling mencolok dibandingkan 4 isolat lainnya. Isolat tersebut dimungkinkan mampu menghasilkan hormon IAA dalam jumlah yang lebih besar. Sedangkan isolat A1a dipilih untuk uji produksi hormon IAA secara kuantitatif karena pada penelitian sebelumnya isolat A1a diketahui resisten terhadap  $\text{HgCl}_2$  10 mg/L (Sakinah dan Zulaika, 2014). Diharapkan ketiga isolat di atas memiliki multipotensi selain resisten terhadap  $\text{HgCl}_2$  juga mampu sebagai bakteri penghasil hormon pertumbuhan IAA.

Tabel 4.1 Hasil Penapisan Isolat *Azotobacter* yang Berpotensi Menghasilkan Hormon IAA

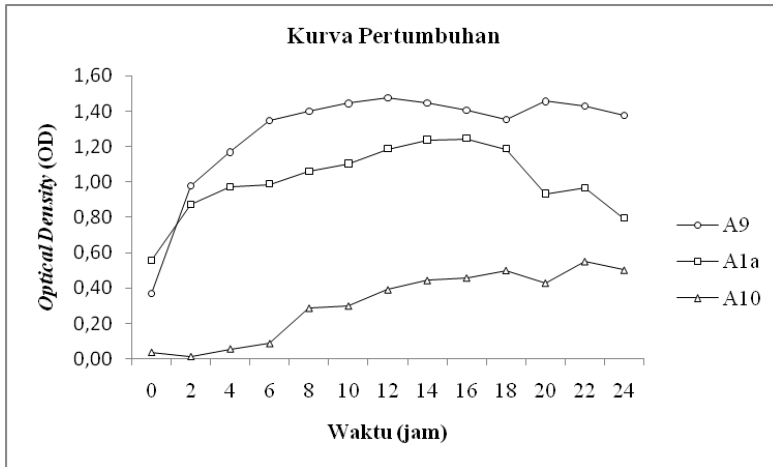
Isolat	Hasil uji kualitatif	Isolat	Hasil uji kualitatif
A1a	+	A6	+
A1b	+	A7	-
A2	-	A8	-
A3	+	A9	++
A5	-	A10	++

Keterangan: +++ : merah, ++ : merah muda, + : sedikit merah muda, - : tidak berwarna merah.

#### 4.2 Umur Perlakuan ( $\mu$ jam) Starter

Kurva pertumbuhan *Azotobacter* digunakan untuk menentukan umur perlakuan starter dalam uji produksi hormon IAA secara kuantitatif. Kurva pertumbuhan dilakukan pada 3 isolat *Azotobacter* terpilih yaitu A1a, A9 dan A10. Penentuan kurva pertumbuhan dilakukan dengan menggunakan metode spektrofotometri dengan mengukur OD (*Optical Density*) nya. Pengukuran OD menggunakan spektrofotometer *Spectronic genesys 20®* dengan panjang gelombang 600nm. Hasil kurva pertumbuhan dari ketiga isolat tersebut ditampilkan pada Gambar 4.2.





Gambar 4.2 Kurva Pertumbuhan *Azotobacter* A9, A1a, dan A10.

Pertumbuhan isolat *Azotobacter* A9 dan A1a memiliki pola pertumbuhan yang hampir sama. Kurva pertumbuhan kedua isolat tersebut tidak terlihat adanya fase lag atau fase adaptasi. Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A10 terlihat adanya fase lag, tetapi relatif singkat yaitu pada jam ke-0 sampai jam ke-2. Hal ini dapat terjadi karena pengukuran OD dilakukan setelah isolat disubkultur pada media yang sama sehingga dapat mempercepat fase lag. Fase lag terjadi ketika bakteri beradaptasi pada medium baru atau suatu kondisi tertentu (Prescott *et al.*, 2002). Pemindahan inokulum ketiga isolat *Azotobacter* dilakukan setelah 24 jam inkubasi pada media yang sama, sehingga mempercepat fase lag atau langsung terjadi fase eksponensial. Fase lag tidak akan terjadi apabila subkultur dilakukan dalam keadaan fase eksponensial pada medium yang sama dan kultur secara cepat akan memasuki fase eksponensial (Madigan *et al.*, 2006).

Fase eksponensial pada isolat *Azotobacter* A1a terlihat pada jam ke-0 sampai jam ke-14 setelah inokulasi. Pada isolat A9 fase eksponensial terlihat pada jam ke-0 sampai jam ke-12. Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A10, fase eksponensial

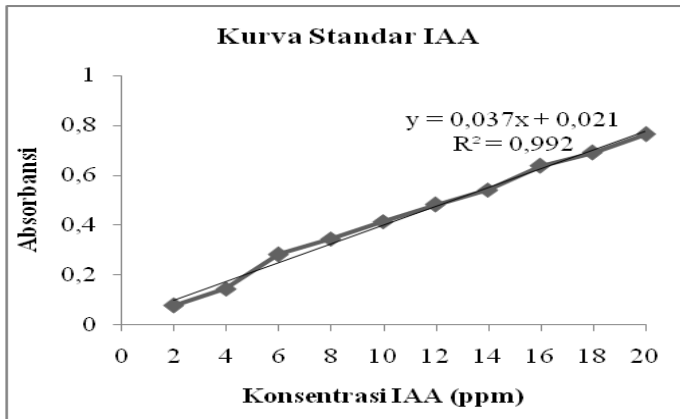
terlihat setelah jam ke-2 sampai jam ke-18. Pada fase eksponensial, bakteri akan tumbuh dan membelah dengan kecepatan yang paling maksimal sesuai dengan genetik, kondisi medium, dan kondisi lingkungan dimana bakteri tumbuh. Laju pertumbuhan selama fase eksponensial akan konstan karena bakteri membelah dan menggandakan jumlahnya dengan interval yang teratur. Populasi bakteri memiliki kondisi yang sama dalam hal kimia dan sifat fisiologis selama fase eksponensial (Prescott *et al.*, 2002).

Setelah jam ke-14 hingga jam ke-18, isolat *Azotobacter* A1a menunjukkan fase stasioner. Pada fase stasioner jumlah sel yang viabel tetap konstan. Hal ini dikarenakan terjadi keseimbangan antara pembelahan sel dan kematian sel (Prescott *et al.*, 2002). Selanjutnya dari jam ke-18 hingga jam ke-24 isolat *Azotobacter* A10 dan A1a mengalami fase kematian. Pada fase kematian terjadi penurunan jumlah sel-sel yang viabel (Prescott *et al.*, 2002). Pada isolat *Azotobacter* A9, fase stasioner terlihat setelah jam ke-12 hingga jam ke-24. Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A10 terlihat pada jam ke-18 sampai jam ke-24. Pada isolat *Azotobacter* A9 dan A10 belum terlihat fase kematian karena penentuan kurva pertumbuhan dilakukan hanya sampai jam ke-24.

Berdasarkan fase-fase pertumbuhan yang telah didapatkan, dilakukan perhitungan rata-rata waktu fase eksponensial sebagai umur perlakuan. Umur perlakuan yang digunakan untuk pengujian produksi IAA pada isolat *Azotobacter* A1a pada jam ke-7, sedangkan pada isolat *Azotobacter* A9 pada jam ke-6 dan isolat *Azotobacter* A10 pada jam ke-10.

### 4.3 Kurva Standar IAA

Penentuan kurva standar IAA (*Indole-3-Acetic Acid*) bertujuan untuk menghitung konsentrasi IAA yang mampu dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* A1a, A9 dan A10 menggunakan persamaan garis  $y = ax + b$ .



Gambar 4.3 Kurva Standar IAA.

Pereaksi yang digunakan untuk mendeteksi IAA adalah pereaksi Salkowski yang merupakan campuran dari besi (III) klorida ( $\text{FeCl}_3$ ) dan asam perklorat ( $\text{HClO}_4$ ). Pereaksi Salkowski berwarna kekuningan dan apabila bercampur dengan IAA akan membentuk warna merah (Rahman *et al.*, 2010).

Nilai konsentrasi IAA ditetapkan sebagai ordinat (sumbu X) dan nilai absorbansi ditetapkan sebagai absis (sumbu Y). Berdasarkan hasil kurva standar yang didapatkan maka persamaan garis yang didapat untuk menghitung konsentrasi IAA adalah  $y = 0,037x + 0,021$  dengan nilai  $R^2 = 0,992$  (Gambar 4.3).

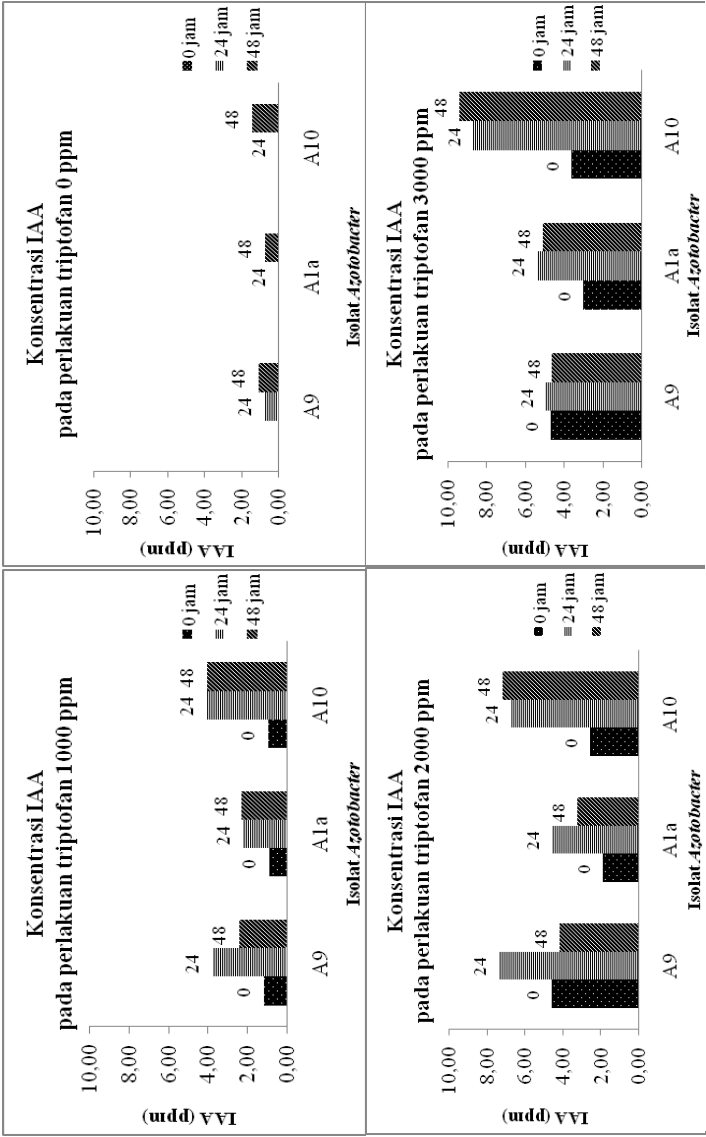
#### 4.4 Produksi IAA oleh isolat *Azotobacter*

Produksi IAA secara kuantitatif menggunakan metode determinasi kolorimetri yang ditunjukkan dengan pereaksi Van Urk Salkowski (Mohite, 2013). Isolat *Azotobacter* yang diuji adalah A1a, A9, dan A10. Hasil uji produksi IAA oleh ketiga isolat *Azotobacter* dapat dilihat pada Gambar 4.4.

Berdasarkan Gambar 4.4 dapat dilihat bahwa konsentrasi triptofan yang lebih tinggi akan menghasilkan konsentrasi IAA yang relatif lebih tinggi pula. Konsentrasi IAA yang paling tinggi

produksi terlihat pada perlakuan suplementasi triptofan 3000 ppm. Produksi auksin oleh bakteri akan meningkat ketika medium kultur ditambahkan dengan suatu prekursor IAA yaitu triptofan (Mohite, 2013). Berdasarkan penelitian yang dilakukan Karnwal (2010), isolat *Pseudomonas* yang diuji pada keadaan tanpa triptofan dan adanya penambahan triptofan menunjukkan bahwa produksi IAA lebih tinggi dikarenakan peningkatan pada konsentrasi triptofan.

Berdasarkan Gambar 4.4 isolat *Azotobacter* A1a dan A9 menunjukkan peningkatan konsentrasi IAA pada inkubasi 24 jam, namun relatif menurun pada inkubasi 48 jam. Menurut Sahasrabudhe (2011), penurunan konsentrasi IAA setelah inkubasi tertentu dimungkinkan karena adanya degradasi oleh isolat bakteri. Penurunan produksi IAA disebabkan adanya pelepasan enzim pendegradasi IAA seperti IAA oksidase dan peroksidase (Shokri dan Emtiazi, 2010). Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A10 menunjukkan peningkatan konsentrasi IAA mulai dari 0 jam sampai dengan 48 jam. Pada isolat *Azotobacter* A10 produksi IAA semakin tinggi sebanding dengan lamanya waktu inkubasi dan besarnya konsentrasi triptofan yang disuplementasikan pada medium. Konsentrasi IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* A10 pada perlakuan inkubasi 48 jam.



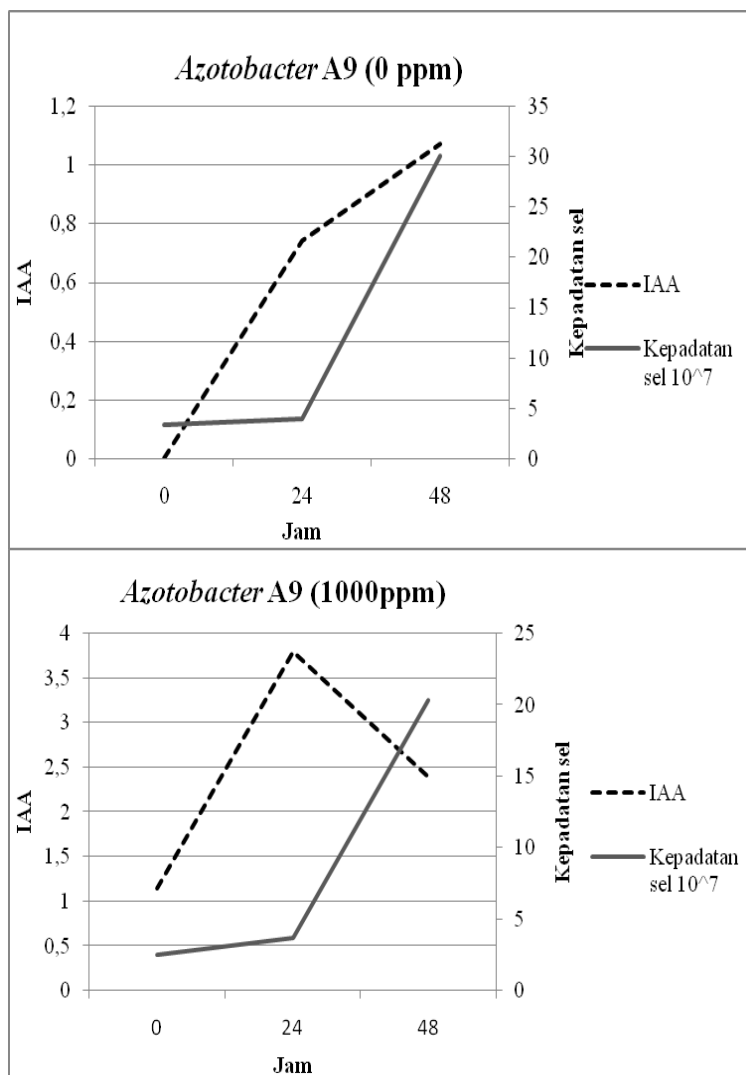
Gambar 4.4 Diagram Batang Hasil Uji Produksi IAA oleh *Azotobacter* A1a, A9 dan A10.

Pada perlakuan penambahan triptofan 0 ppm atau tanpa penambahan triptofan, konsentrasi IAA pada isolat *Azotobacter* A1a, A9 dan A10 tidak terukur pada jam ke-0 inkubasi. Namun pada inkubasi 24 jam, terlihat isolat *Azotobacter* A9 dapat menghasilkan IAA walaupun dengan konsentrasi yang relatif kecil. Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A1a dan A10, pada waktu inkubasi 0 jam dan 24 jam tidak terukur adanya IAA yang dihasilkan, namun pada inkubasi 48 jam terlihat adanya IAA yang dihasilkan dengan jumlah yang relatif kecil. Menurut Halda dan Alija (2003), IAA dapat diproduksi pada konsentrasi yang rendah ketika L-triptofan yang merupakan prekursor IAA tidak ditambahkan ke media kultur. Hal ini dikarenakan bakteri mensintesis L-triptofan atau sintesis IAA dari L-triptofan terjadi secara independen dan tidak terjadi suplementasi triptofan dari luar (Halda dan Alija, 2003).

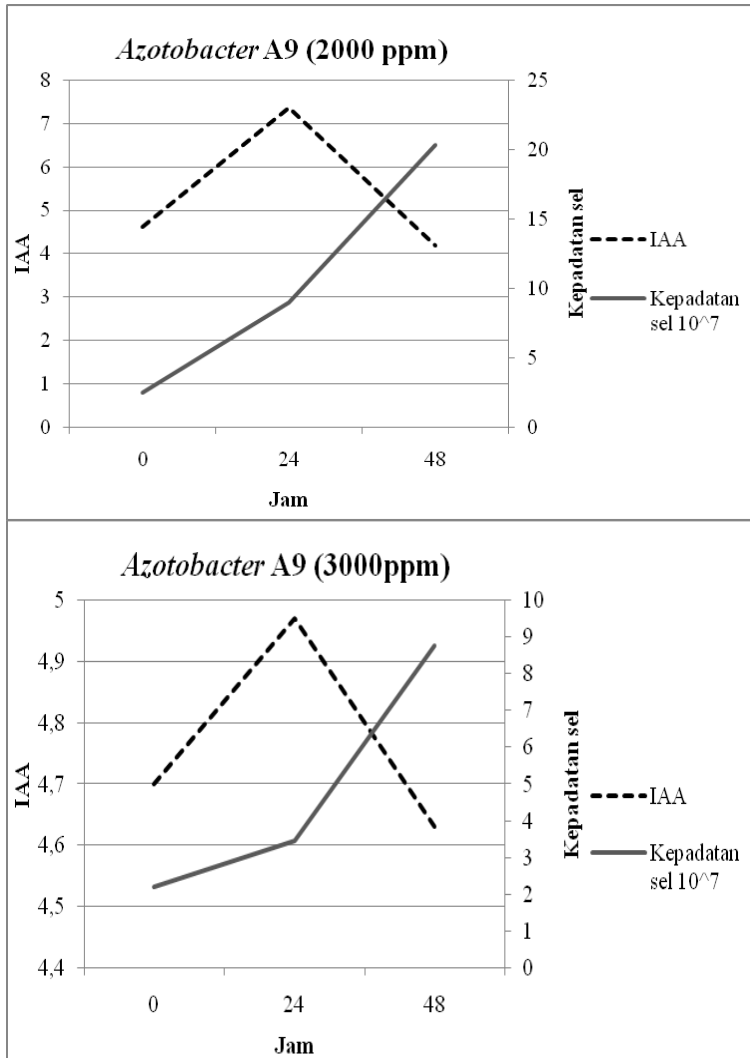
Pada isolat *Azotobacter* A10 jumlah IAA yang dihasilkan semakin tinggi sebanding dengan kepadatan sel pada kultur (Tabel 4.2) (Gambar 4.5c). Menurut El-Mahrouk dan Belal (2007) akumulasi IAA sebanding dengan kenaikan pada kecepatan pertumbuhan inokulum pada kultur. Namun pada isolat *Azotobacter* A9 dan A1a, kepadatan sel pada 48 jam semakin tinggi tidak sebanding dengan konsentrasi IAA yang dihasilkan (Tabel 4.2) (Gambar 4.5a-b). Hal ini dimungkinkan sel mati atau tidak viabel terhitung pada metode perhitungan sel menggunakan hemasitometer sehingga jumlah sel yang terhitung menjadi lebih besar. Perhitungan menggunakan hemasitometer, sel yang mati dan sel yang hidup semua terhitung (Harley dan Prescott, 2002). Sehingga jumlah IAA yang dihasilkan sesuai dengan jumlah sel yang hidup saja.

Tabel 4.2 Produksi IAA secara Kuantitatif oleh Isolat *Azotobacter* A9, A1a, dan A10

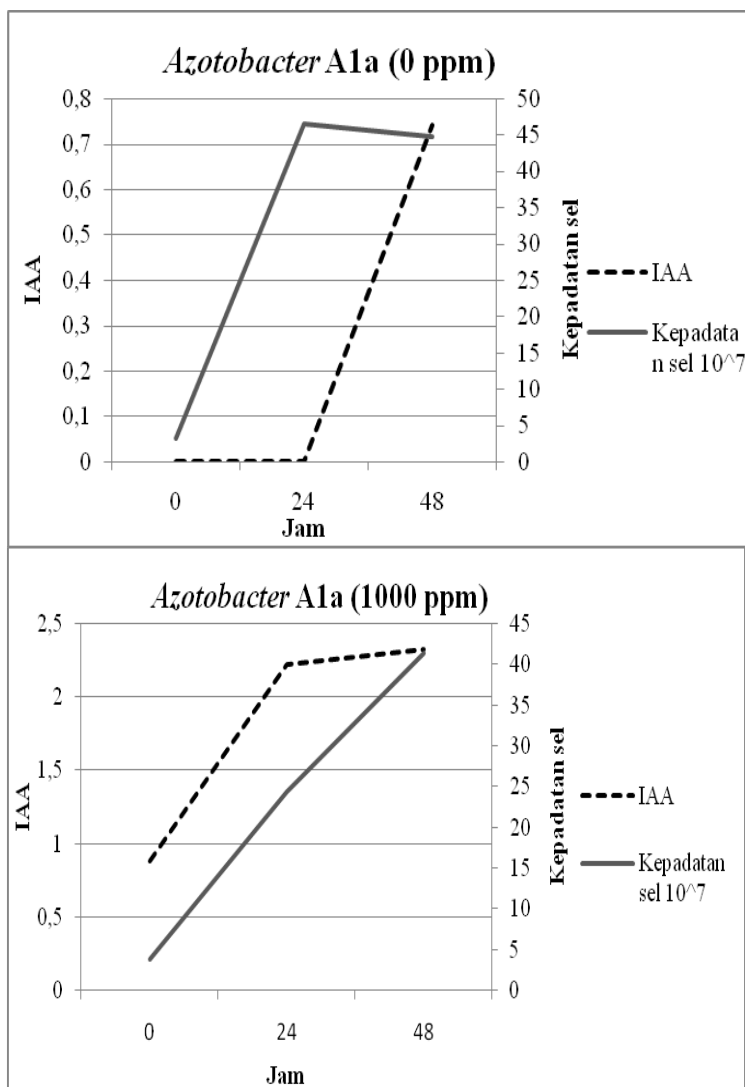
Konsentrasi trp (ppm)	Waktu (jam)	A9		A1a		A10	
		Kepadatan sel	IAA	Kepadatan sel	IAA	Kepadatan sel	IAA
0	0	$3,35 \times 10^7$	0,00	$3,31 \times 10^7$	0,00	$3,37 \times 10^7$	0,00
	24	$3,89 \times 10^7$	0,74	$46,5 \times 10^7$	0,00	$25,8 \times 10^7$	0,00
	48	$30,0 \times 10^7$	1,07	$44,8 \times 10^7$	0,74	$32,8 \times 10^7$	1,41
1000	0	$2,51 \times 10^7$	1,14	$3,84 \times 10^7$	0,88	$3,23 \times 10^7$	0,95
	24	$3,73 \times 10^7$	3,79	$24,3 \times 10^7$	2,22	$26,8 \times 10^7$	4,03
	48	$20,3 \times 10^7$	2,39	$41,3 \times 10^7$	2,32	$50,5 \times 10^7$	4,06
2000	0	$2,44 \times 10^7$	4,62	$5,21 \times 10^7$	1,89	$3,70 \times 10^7$	2,59
	24	$8,92 \times 10^7$	7,38	$29,3 \times 10^7$	4,62	$24,3 \times 10^7$	6,76
	48	$20,3 \times 10^7$	4,18	$27,3 \times 10^7$	3,27	$48,0 \times 10^7$	7,19
3000	0	$2,20 \times 10^7$	4,70	$4,08 \times 10^7$	3,03	$4,51 \times 10^7$	3,63
	24	$3,46 \times 10^7$	4,97	$32,5 \times 10^7$	5,40	$44,8 \times 10^7$	8,72
	48	$8,75 \times 10^7$	4,63	$35,3 \times 10^7$	5,10	$53,8 \times 10^7$	9,45

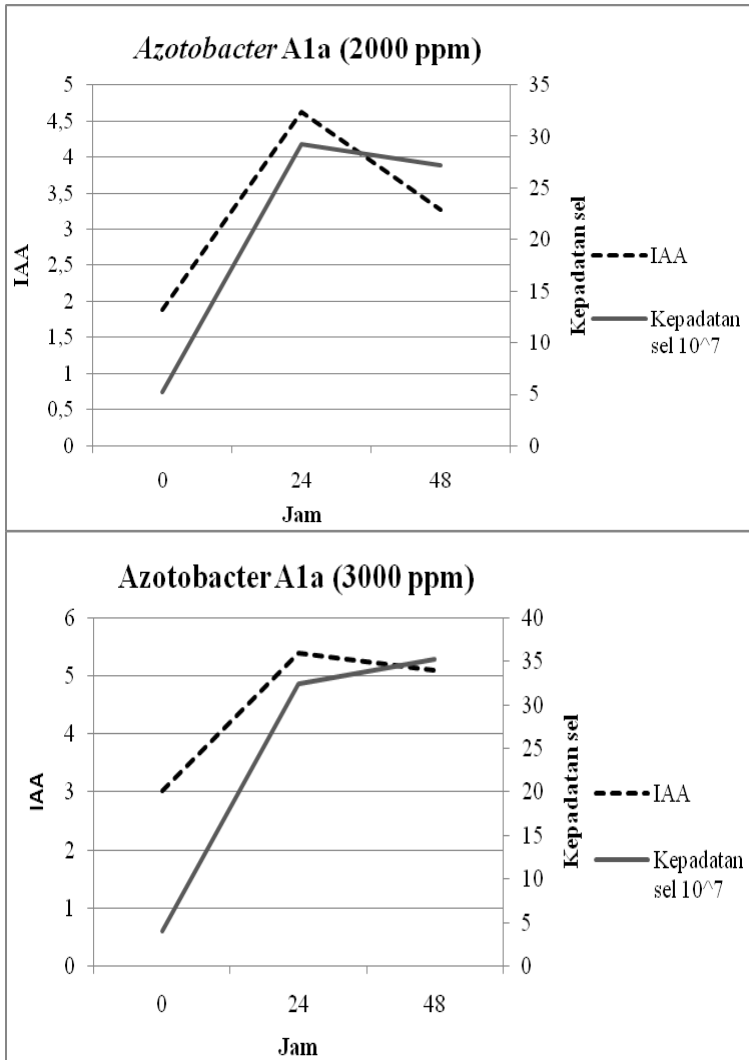




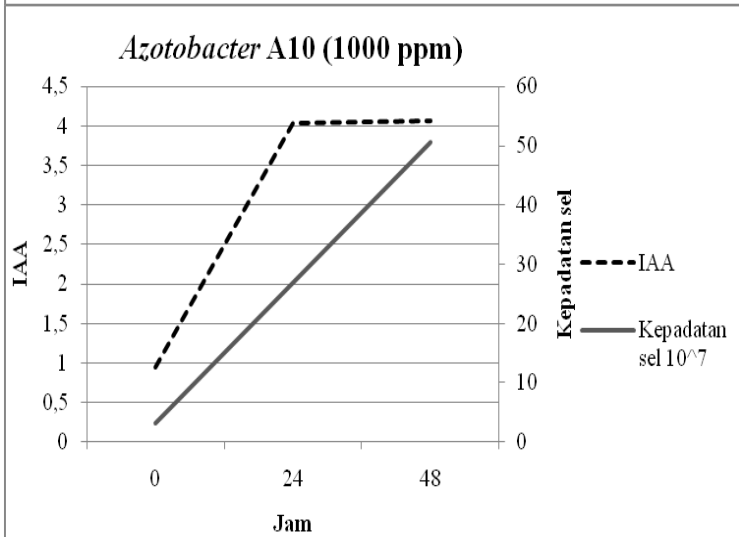
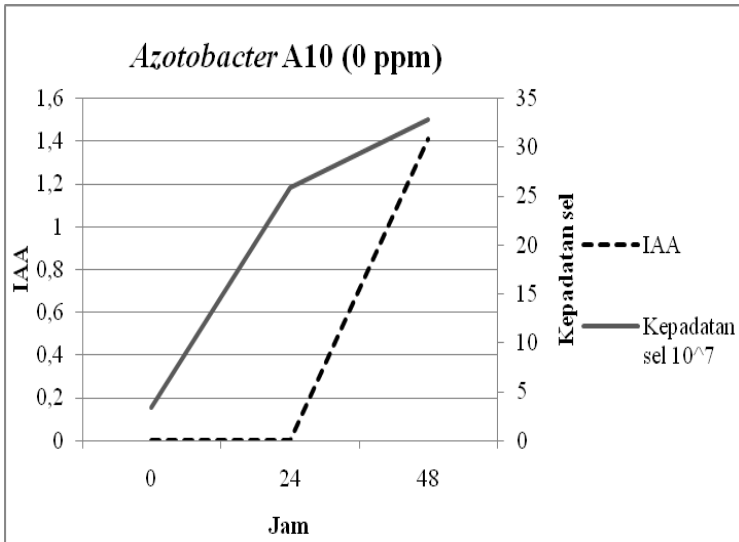


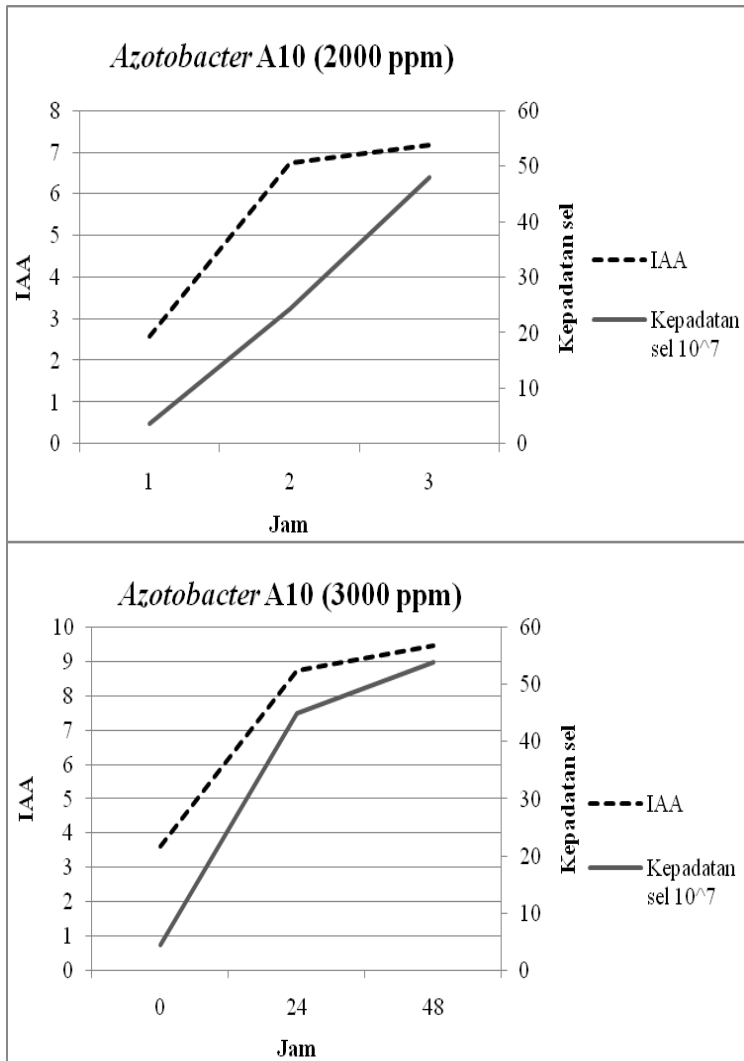
Gambar 4.5-a Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat *Azotobacter* A9 pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.





Gambar 4.5-b Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat *Azotobacter* A1a pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.





Gambar 4.5-c Hubungan Kepadatan Sel dan Produksi IAA pada Isolat *Azotobacter* A10 pada Perlakuan Triptofan yang Berbeda.

Berdasarkan Tabel 4.2, isolat *Azotobacter* yang menghasilkan IAA dengan konsentrasi yang paling tinggi adalah isolat *Azotobacter* A10 pada perlakuan penambahan triptofan 3000 ppm dengan inkubasi 48 jam yaitu 9,45 ppm serta memiliki jumlah kepadatan sel paling tinggi yaitu  $5,38 \times 10^8$ . Pada isolat *Azotobacter* A10 memiliki rata-rata jumlah IAA yang relatif besar dengan kepadatan sel yang relatif tinggi pula. Sedangkan pada isolat *Azotobacter* A9, konsentrasi IAA tertinggi yang mampu dihasilkan sebesar 7,38 ppm pada perlakuan penambahan triptofan 2000 ppm dengan masa inkubasi 24 jam dengan kepadatan sel  $8,92 \times 10^7$ . Rata-rata jumlah konsentrasi IAA yang paling rendah dari kesemua perlakuan dihasilkan oleh isolat *Azotobacter* A1a. Isolat *Azotobacter* A1a menghasilkan IAA tertinggi hanya sebesar 5,40 ppm dengan jumlah kepadatan sel yang cukup tinggi yaitu  $3,25 \times 10^8$  pada perlakuan penambahan triptofan 3000 ppm dengan waktu inkubasi 24 jam.

Isolat *Azotobacter* A9 dan A1a memproduksi IAA yang optimal pada inkubasi 24 jam, sedangkan isolat *Azotobacter* A10 waktu inkubasi yang optimal pada 48 jam. Menurut Shokri dan Emtiazi (2010), produksi maksimum IAA dicapai ketika jumlah L-triptofan optimum dan berbeda-beda untuk setiap strain bakteri. Produksi IAA sangat bervariasi antara spesies yang satu dengan yang lain dan juga tergantung kondisi kultur, tahap pertumbuhan, dan ketersediaan substrat (Chaiharu dan Lumyong, 2011).

Berdasarkan uji Anova, perbedaan isolat *Azotobacter* yang digunakan sebagai uji memiliki nilai  $\text{Sig.} = 0,312 > \alpha = 0,05$  maka gagal tolak  $H_0$ , sehingga tidak ada perbedaan antara ketiga isolat *Azotobacter* dalam menghasilkan IAA. Begitu pula dengan waktu inkubasi, dari uji Anova didapatkan nilai  $\text{Sig.} = 0,085 > \alpha = 0,05$  maka gagal tolak  $H_0$ , sehingga dapat disimpulkan bahwa waktu inkubasi 0, 24, dan 48 jam tidak menyebabkan perbedaan produksi IAA yang signifikan.

Pada perlakuan penambahan triptofan, uji Anova tidak dapat dilakukan karena asumsi pada uji Anova tidak terpenuhi sehingga

dilakukan uji non parametrik Kruskal Wallis. Berdasarkan hasil uji Kruskal Wallis didapatkan nilai  $\text{Sig.} = 0,000 < \alpha = 0,05$  maka tolak  $H_0$  atau terima  $H_1$  sehingga dapat disimpulkan terdapat pengaruh perlakuan konsentrasi triptofan terhadap konsentrasi IAA yang dihasilkan.

Berdasarkan hasil tersebut semakin tinggi konsentrasi triptofan yang ditambahkan akan menghasilkan IAA semakin tinggi pula. Menurut penelitian yang dilakukan Chaiarn dan Lumyong (2011), sebagian besar dari isolat bakteri yang diteliti memproduksi IAA lebih tinggi ketika ada penambahan prekursor yaitu L-triptofan dan kemungkinan sintesis IAA melalui jalur *Trp-pathways*. Pada kondisi alami, akar tanaman mensekresikan bahan organik termasuk L-triptofan yang dapat dimanfaatkan bakteri untuk biosintesis IAA (Ahmad *et al.*, 2005).

## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

Berdasarkan hasil dan pembahasan pada penelitian ini dapat disimpulkan:

1. Isolat *Azotobacter* yang berpotensi menghasilkan hormon auksin (IAA) ialah *Azotobacter* A1a, A1b, A3, A6, A9 dan A10.
2. Konsentrasi IAA tertinggi dihasilkan oleh isolat tersebut *Azotobacter* A10 sebesar 9,45 ppm, diikuti isolat *Azotobacter* A9 sebesar 7,38 ppm dan isolat *Azotobacter* A1a sebesar 5,40 ppm.

#### **5.2 Saran**

Potensi isolat *Azotobacter* sebagai penghasil IAA yang diisolasi dari *Eco Urban Farming* ITS perlu dilakukan penelitian mengaplikasikan ke media tanaman pada skala laboratorium (green house) yang faktor lingkungannya terkendali.



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## DAFTAR PUSTAKA

Adds, J., Larckom, E., Miller, R., dan Sutton, R. 2001. **Tools, Techniques and Assessment in Biology**. Cheltenham, U.K. Nelson Thornes Ltd.

Ahmad, F., Ahmad, I., dan Khan, M.S. 2005. Indole Acetic Acid Production by the Indigenous Isolates of *Azotobacter* and Fluorescent *Pseudomonas* in the Presence and Absence of Tryptophan. **Turk J Biol** : 29-34.

Amutha, R., Karunakaran, S., Dhanasekaran, S., Hemalatha, K., Monika, R., Shanmugapriya, P., dan Sornalatha, T. 2014. **Isolation and Mass Productoin of Biofertilizer (Azotobacter and Phosphobacter)**. International Journal of Latest Research in Science and Technology 3 (1) : 79-81.

Arlianti, T., Syahid., S.F., Kristina, N.N., dan Rostiana., O. 2013. Pengaruh Auksin IAA, IBA, dan NAA terhadap Induksi Perakaran Tanaman Stevia (*Stevia rebaudiana*) secara In Vitro. **Bul.Littro** 24 (2) :57-62.

Campbell, N.A., Reece, J.B., dan Mitchell, L.G. 2000. **Biologi Edisi Kelima Jilid 2**. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Chaiharn, M., dan Lumyong, S. 2011. Screening and Optimization of Indole-3-Acetic Acid Production and Phosphate Solubilization from Rhizobacteria Aimed at Improving Plant Growth. **Curr Microbiol** 62 : 173-181.

Cooper, S. 2003. **Bacterial Growth and Division: Biochemistry and Regulation of Prokaryotic and Eukaryotic Division Cycles**. San Diego: Academic Press.

Dobrev, P.I., Havlicek, L., Vagner, M., Malbeck, J., dan Kaminek, M. 2005. Purification And Determination Of Plant Hormones Auxin And Absciscic Acid Using Solid Phase Extraction And Two Dimensional High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography A** 1075: 159-166.

El-Mahrouk, M.E., dan Belal, E.B.A. 2007. Production Of Indole Acetic Acid (Bioauxin) from *Azotobacter* sp. Isolate And Its Effect on Callus Induction of *Dieffenbachia maculata* cv. Marianne. **Acta Biologica Szegediensis** 51(1) : 53-59.

Halda, L. dan Alija. 2003. Identification of indole-3-acetic acid producing freshwater wetland rhizosphere bacteria associated with *Juncus effusus* L. **Canadian Journal of Microbiology** 49: 781-787.

Hamastuti, H., Dwi, E., Juliastuti, S.R., dan Hendrianie, N. Peran Mikroorganisme *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Aspergillus niger* pada Pembuatan Kompos Limbah Industri Sludge Industri Pengolahan Susu. **Jurnal Teknik Pomits** 1 (1) : 1-5.

Harley, J.P., dan Prescott, L.M. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology, Fifth Edition**. The McGraw-Hill Companies.

Hindersah, R., Yulina, H., dan Nurbaity, A. 2013. Penggunaan Pupuk Organik Cair sebagai Media Produksi Inokulan *Azotobacter chroococcum*. **Agrologia Jurnal Ilmu Budidaya Tanaman** 2 (2): 102-108.

Hindersah, R. dan Arief, D.H. 2010. Pengaruh Inokulasi *Azotobacter* Penghasil Eksopolisakarida terhadap Berat Kering

dan Kandungan Kadmium Kubis (*Brassica oleracea*) di Tanah yang Dikontaminasi Kadmium. **Jurnal Agrikultura** 2(1) : 46-50.

Holt, J.G., N.R. Krieg, P.H.A. Sneath, J.T. Staley dan S.T. Williams. 1994. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology** 9th Edition. New York: Lippincott Williams and Wilkins.

Karjadi, A.K., dan Buchory, A. 2007. Pengaruh Penambahan Auksin dan Sitokinin terhadap Pertumbuhan Tunas Bawang Putih. **Jurnal Hortikultura** 17(4): 314-320.

Karlovsky, P. 2008. **Secondary Metabolites in Soil Ecology. Soil Biology** 14. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Karnwal, A. 2009. Production of Indole Acetic Acid by Fluorescent *Pseudomonas* in The Presence of L-Tryptophan And Rice Root Exudates. **Journal of Plant Pathology** 91 (1) : 61-63.

Khotimah, K., dan Zulaika, E. 2014. *Azotobacter* sebagai Bioakumulator Merkuri. **Jurnal Sains Pomits** 3(2): E30-E32.

Kresnawaty, I., Andanarawih, S., Suharyanto, Panji, T. 2008. Optimisasi dan Pemurnian IAA yang dihasilkan *Rhizobium* sp. dalam Medium Serum Lateks dengan Suplementasi Triptofan dari Pupuk Kandang. **Menara Perkebunan** 76(2) : 74-82.

Kusuma, R.W.A., dan Zulaika, E. 2014. Potensi *Chlorella* sp. sebagai Bioakumulator Logam Berat Kadmium. **Jurnal Sains dan Seni Pomits** 3(2): E71-E74.

Lestari, P.L., Susilowati, D.N., dan Riyanti, E.I. 2007. Pengaruh Hormon Asam Indol Asetat yang Dihasilkan *Azospirillum* sp.

terhadap Perkembangan Akar Padi. **Jurnal AgroBiogen** 3(2): 66-72.

Madigan, M. T., Martinko, J., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2006. **Biology of Microorganisms**. Pearson Education, Inc. Benjamin Cummings: Netherlands.

Madigan, M. T., Martinko, J., Stahl, D.A., dan Clark, D.P. 2012. **Brock Biology of Microorganisms 13<sup>th</sup> edition**. San Fransisco: Benjamin Cummings.

Mali, G.V dan Bodhankar, M.G. 2009. Antifungal and Phytohormone Production Potential of *Azotobacter chroococcum* Isolates from Groundnut (*Arachis hypogea* L.) Rhizosphere. **Asian J. Exp. Sci** 23(1) : 293-297.

Mohammadi, K., dan Sohrabi, Y. 2012. Bacterial Biofertilizers for Sustainable Crop Production : A Review. **Journal of Agricultural and Biological Science** 7(5): 307-316.

Mohite, B. 2013. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition** 13(3): 638-649.

Prescott, L.M., Harley, J.P., dan Klein, D.A. 2002. **Microbiology 5th Edition**. The McGraw-Hill Companies.

Rahman, A., Sitepu, I.R., Tang, S.Y., dan Hashidoko, Y. 2010. Salkowski's Reagent Test As A Primary Screening Index for Functionalities of Rhizobacteria Isolated from Wild Dipterocarp Saplings Growing Naturally on Medium-Strongly Acidic Tropical Peat Soil. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 74 (11) : 1003600-1-7.

Sakinah, A.L., dan Zulaika, E. 2014. Resistensi *Azotobacter* terhadap  $\text{HgCl}_2$  yang Berpotensi Menghasilkan Enzim Merkuri Reduktase. **Jurnal Sains dan Seni Pomits** 3(2): E84-E86.

Sahasrabudhe, M.M. 2011. Screening of Rhizobia for Indole Acetic Acid Production. **Annals of Biological Research** 2(4): 460-468.

Saribay, G. 2003. Growth and Nitrogen Fixation Dynamics of *Azotobacter chroococcum* in Nitrogen-Free and OMW Containing Medium. **Thesis**. The Middle East Technical University.

Shokri, D. and Emtiazi, G. 2010. Indole-3-acetic acid (IAA) Production in Symbiotic and Non-Symbiotic Nitrogen-Fixing Bacteria and its Optimization by Taguchi Design. **Curr Microbiol** 61: 217-225.

Spaepen, S., Vanderleyden, J., dan Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiol Rev** :1-24.

Sholikah, U., dan Kuswytasari, N.D. 2012. **Uji Potensi Genera *Bacillus* Sebagai Bioakumulator Merkuri**. Surabaya: Biologi ITS.

Sutarya, R. 2011. **Seleksi Mikroba Potensial untuk Pembuatan Pupuk Majemuk Hayati dalam Upaya Penghematan Pupuk Sintesis (25%) pada Tanaman Cabai**. Laporan penelitian. Balai Penelitian Tanaman Sayuran : Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.

Szkop, M., and Bielawski, W. 2013. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds

related to bacterial biosynthesis of Indole-3-acetic acid. **Antonie Van Leeuwenhoek** 103: 683 – 691.

Tanaka, E., Tanaka, C., Ishihara, A., Kuwahara, Y., dan Tsuda, M. 2003. Indole-3-acetic acid biosynthesis in *Aciculosporium take*, a causal agent of witches' broom of bamboo. **J Gen Plant Pathol** 69:1–6.

Toth, M.E., Borsodi, A.K., Felfoldi, T., Vajna, B., Sipos, R., dan Marialigeti, K. 2013. **Practical Microbiology based on the Hungarian practical notes entitled “Mikrobiologiai Laboratoriumi Gyakorlatok”**. Eotvos Lorand University.

Widawati, S. 2010. Teknologi Inovatif Mikroba Biofertilizer untuk Mempercepat Reklamasi Lahan Pertanian di Kawasan Penyangga Gunung Salak dan Mikroba Endofitik untuk Agen Biokontrol *Fusarium oxysporum* dan *Rhizoctonia solani*. **Laporan Akhir Program Insentif Peneliti dan Perekayasa**. Cibinong : LIPI.

Widiastuti, H., Siswanto, Suharyanto. 2010. Karakterisasi dan Seleksi Beberapa Isolat *Azotobacter* sp. untuk Meningkatkan Perkecambahan Benih dan Pertumbuhan Tanaman. **Buletin Plasma Nutfah** 16(2) : 160-167.

Yuniarti, E., dan Purwani, J. 2007. Mikroba Penghasil Asam Indol Asetat. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian.

Zulaika, E., Shovitri, M., Kuswytasari, N.D. 2014. Numerical Taxonomy for Detecting the Azotobacterial Diversity. **The 8th Korean-Asean Joint Symposium on Biomass Utilization and**

**Renewable Energy.** Korea 19-20 August. Seoul: Korea University.



**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**

## LAMPIRAN

### Lampiran 1: Komposisi Reagen

#### Pereaksi Salkowski

larutan  $\text{FeCl}_3$  0,5M

2ml

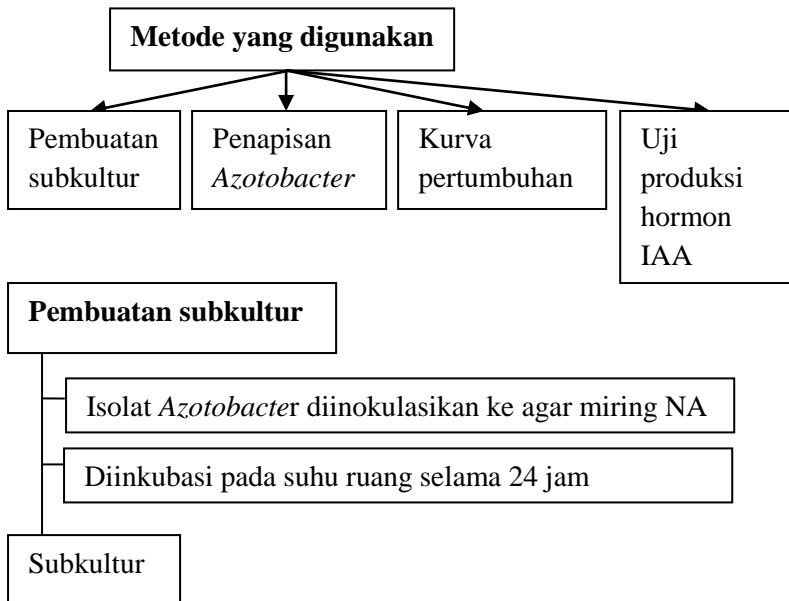
$\text{HClO}_4$  35 %

98ml

(Mali dan Bodhankar, 2009).

Larutan tersebut dimasukkan dalam botol gelap. Pereaksi Salkowski akan membentuk larutan berwarna merah saat bereaksi dengan IAA yang dapat terukur pada panjang gelombang 530 nm.

### Lampiran 2 : Skema Kerja



**Penapisan *Azotobacter***

1 ose isolat diinokulasikan ke agar datar NA-Triptofan

Diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam

Ditetesi pereaksi Salkowski

Diinkubasi di ruang gelap selama 30 menit

Hasil

**Kurva pertumbuhan**

1 isolat diinokulasikan ke 20 ml media NB

Diinkubasi pada suhu ruang 24 jam di *rotary shaker*

Ditambahkan ke 180 ml media NB

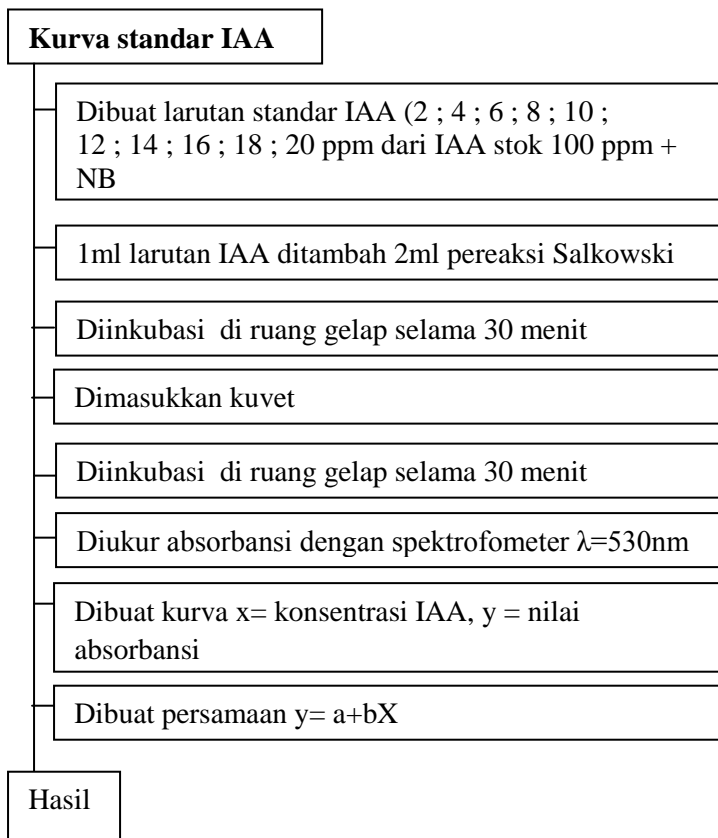
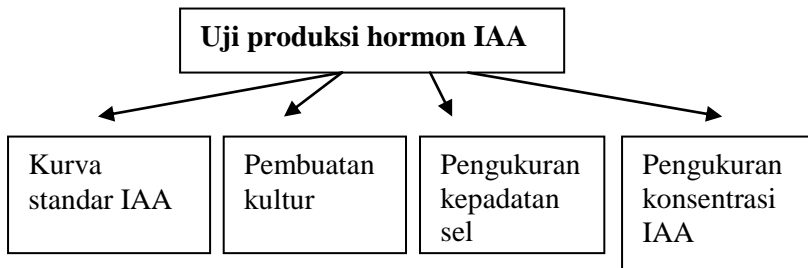
Diinkubasi pada suhu ruang 24 jam di *rotary shaker*

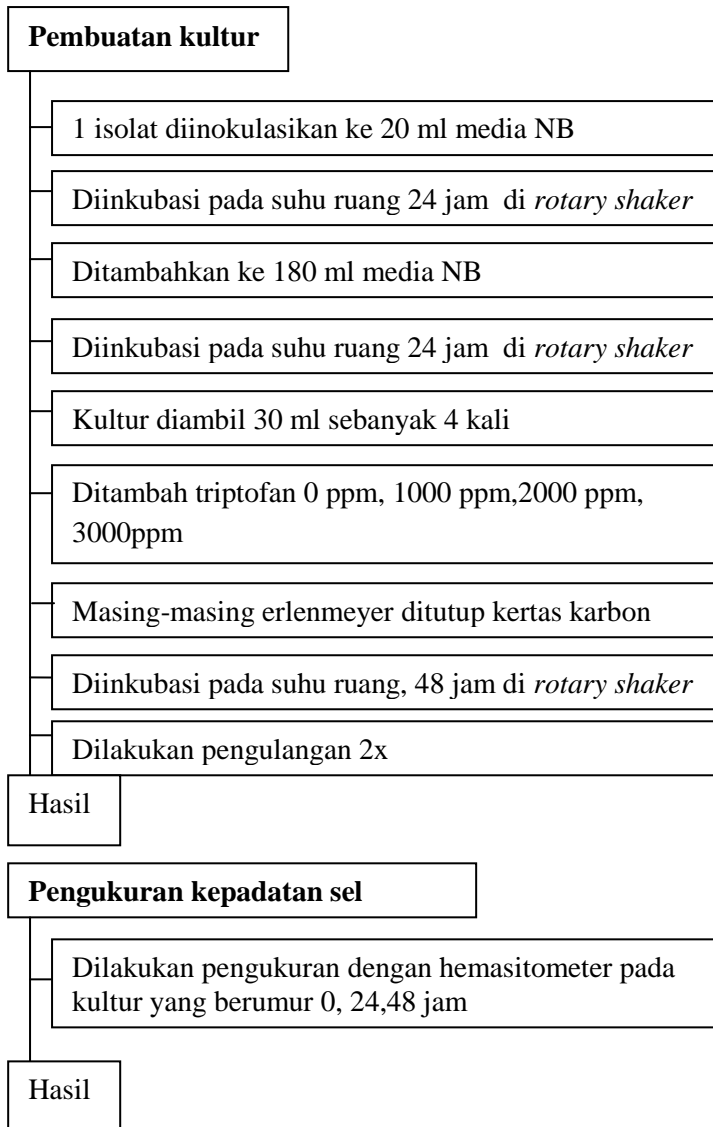
2 ml kultur dimasukkan kuvet

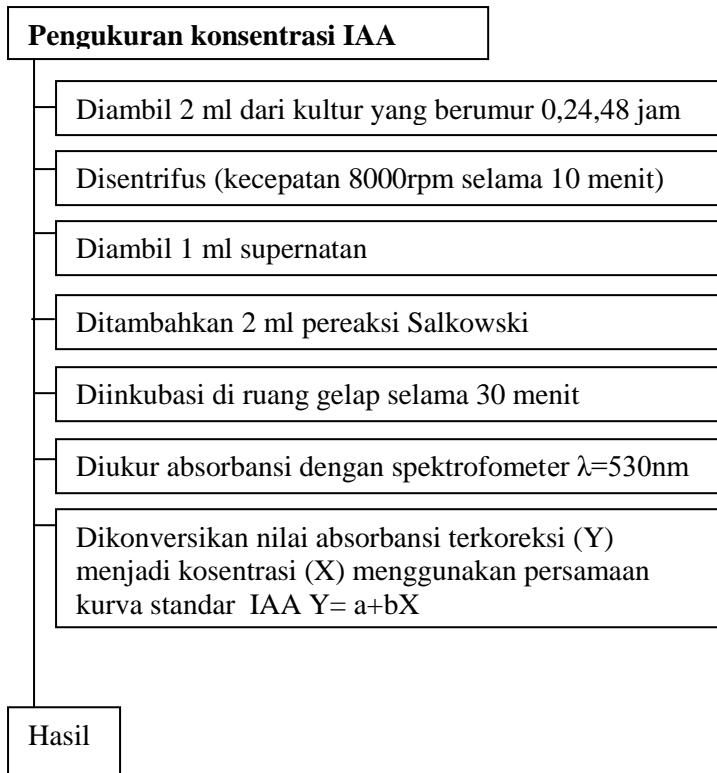
Diukur absorbansi dengan spektrofometer  $\lambda=600\text{nm}$

Dibuat kurva x= waktu, y= nilai absorbansi

Hasil







### Lampiran 3: Hasil Uji Statistik

#### 1. Faktor : Isolat

- Uji Normalitas: menggunakan Shapiro-Wilk jika data <50.

Jika nilai Sig. > 0,05 maka berdistribusi normal atau memenuhi asumsi ANOVA.

isolat	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IAA A9	.171	12	.200*	.929	12	.367
A1A	.131	12	.200*	.933	12	.417
A10	.167	12	.200*	.926	12	.339

\*Nilai Sig. = 0,367; 0,417; 0,339 > 0,05, maka data berdistribusi normal sehingga memenuhi asumsi.

➤ Uji Homogenitas:

Jika nilai Sig. > 0,05 maka data homogen atau memenuhi asumsi ANOVA.

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.187	2	33	.128

\*Nilai Sig. = 0,128 > 0,05 maka data homogen sehingga memenuhi asumsi

ANOVA

Jika nilai Sig. < 0,05 maka terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah konsentrasi IAA yang dihasilkan.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15.565	2	7.783	1.206	.312
Within Groups	212.914	33	6.452		
Total	228.479	35			

\*Nilai Sig. = 0,312 > 0,05 maka tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara ketiga dalam menghasilkan IAA.

## 2. Faktor : Triptofan

- Uji Normalitas: menggunakan Shapiro-Wilk jika data < 50.

Jika nilai Sig. > 0,05 maka berdistribusi normal atau memenuhi asumsi ANOVA.

triptofan	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IAA 0	.341	9	.003	.782	9	.013
1000	.189	9	.200*	.870	9	.123
2000	.187	9	.200*	.922	9	.409
3000	.299	9	.020	.844	9	.064

\*Nilai Sig. = 0,013; 0,064 < 0,05, maka data tidak berdistribusi normal sehingga tidak memenuhi asumsi.

Karena salah satu asumsi untuk uji Anova tidak terpenuhi maka tidak dapat melakukan uji Anova, melainkan uji non-parametrik menggunakan Kruskal-Wallis.

## Kruskal Wallis

	IAA
Chi-Square	25.274
df	3
Asymp. Sig.	.000



\*Nilai Sig. = 0,000 > 0,05 maka terdapat pengaruh dari perbedaan konsentrasi triptofan terhadap jumlah IAA yang dihasilkan.

### 3. Faktor : Waktu

- Uji Normalitas: menggunakan Shapiro-Wilk jika data <50.

Jika nilai Sig. > 0,05 maka berdistribusi normal atau memenuhi asumsi ANOVA.

waktu	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
IAA 0	.180	12	.200*	.901	12	.162
24	.130	12	.200*	.951	12	.650
48	.143	12	.200*	.927	12	.349

\*Nilai Sig.= 0,162 ; 0,650 ;0,349 >0,0, maka data berdistribusi normal sehingga memenuhi asumsi.

- Uji Homogenitas:

Jika nilai Sig. > 0,05 maka data homogen atau memenuhi asumsi ANOVA.

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.975	2	33	.388

\*Nilai Sig. = 0,388 > 0,05 maka data homogen sehingga memenuhi asumsi.

### ANOVA

Jika nilai Sig. < 0,05 maka terdapat perbedaan yang signifikan pada jumlah konsentrasi IAA yang dihasilkan.

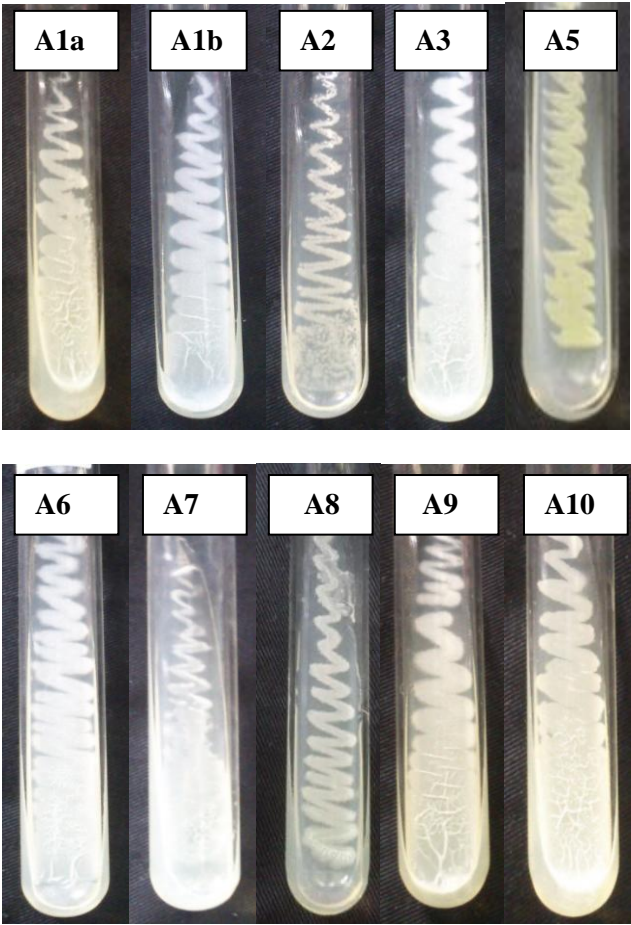
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31.774	2	15.887	2.665	.085
Within Groups	196.705	33	5.961		
Total	228.479	35			

\*Nilai Sig.= 0,312 > 0,05 maka waktu inkubasi tidak menyebabkan perbedaan yang signifikan pada konsentrasi IAA yang dihasilkan.

#### Lampiran 4: Tabel Absorbansi IAA

IAA (ppm)	absorbansi	IAA (ppm)	absorbansi
2	0,075	12	0,481
4	0,143	14	0,54
6	0,281	16	0,637
8	0,344	18	0,689
10	0,413	20	0,763

Lampiran 5: Subkultur isolat *Azotobacter*



## BIODATA PENULIS



Penulis dilahirkan di Mojokerto pada tanggal 10 Februari 1993. Penulis merupakan alumni dari SMPN 1 Kota Mojokerto. Pada tahun 2011 penulis lulus dari SMA Negeri 1 Sooko Kab. Mojokerto dan pada tahun yang sama lulus seleksi masuk ITS melalui jalur Seleksi Nasional Masuk Perguruan Tinggi Negeri pada jurusan Biologi FMIPA ITS.

Selama kuliah di Institut Teknologi Sepuluh Nopember penulis pernah bergabung dalam Himpunan Mahasiswa Biologi ITS sebagai Staff Pengembangan Sumber Daya Mahasiswa (PSDM) 2012-2013. Perempuan yang hobi membaca, mendengarkan musik dan *travelling* ini, mengikuti berbagai macam pelatihan kepribadian dan pengembangan karakter yang diselenggarakan Institut Teknologi Sepuluh Nopember (ITS) Surabaya. Penulis juga merupakan lulusan dari Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa pra-Tingkat Dasar (LKMM pra-TD) ITS dan Latihan Keterampilan Manajemen Mahasiswa Tingkat Dasar (LKMM TD) Biologi ITS. Ketertarikan penulis dalam bidang mikrobiologi mendorongnya untuk melakukan kerja praktek di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Biologi Bidang Mikrobiologi dan melakukan penelitian tugas akhir dalam bidang yang sama. Selain itu penulis juga pernah menjadi Asisten Praktikum Mikrobiologi sebagai bukti ketertarikannya di bidang mikrobiologi.